Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

GLC - METHODE ZUR ROUTINEMÄSSIGEN BESTIMMUNG VON PREGNANDIOL UND PREGNANTRIOL IM URIN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Kuschak

aus Berlin

Marburg 1976

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0044

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

GLC - METHODE ZUR ROUTINEMÄSSIGEN BESTIMMUNG VON PREGNANDIOL UND PREGNANTRIOL IM URIN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Kuschak

aus Berlin

Marburg 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 31.3.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Professor Dr. F. Neurath
Referent:	Professor Dr. G. Sturm
Correferent:	Privatdozent Dr. R. Braun

Inhaltsverzeichnis

A Allgemeiner Teil

1. Einleitung und Problemstellung

2. Historische Entwicklung der PD- und PT-Analytik

3. Chemie und Physiologie des Progesterons und seiner Metabolite

a) Der chemische Aufbau der C 21 Steroide

b) Bedeutung des Progesterons im mensuellen Zyklus und in der Schwangerschaft

c) Biogenese und Metabolismus des Progesterons

B Experimenteller Teil

4. Grundlagen und Beschreibung gaschromatographischer Bestimmungen

5. Die Durchführung der Analysen zur Bestimmung von Pregnandiol und Pregnantriol

a) Reagenzien und Geräte

b) Herstellen der Säulenfüllungen

c) Hydrolyse

d) Extraktion

e) Silylierung und Gaschromatographie

C Ergebnisse

a) Berechnung der Ergebnisse

6. Prüfung der Ergebnisse an Hand der Zuverlässigkeitskriterien

a) Spezifität

b) Richtigkeit

c) Genauigkeit

d) Empfindlichkeit

7. Normalwerte

D Diskussion

E Zusammenfassung

F Literaturverzeichnis

GLC-Methode zur routinemäßigen Bestimmung von Pregnandiol und Pregnantriol im Urin.

A Allgemeiner Teil

1. Einleitung und Problemstellung

Die Bedeutung von 5ß-Pregnan-3α,20α-diol (Pregnandiol, PD) und 5ß-Pregnan-3α, 17α, 20α-triol (Pregnantriol, PT) im Rahmen der Steroidanalytik läßt sich daran erkennen, daß in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Meßmethoden veröffentlicht wurden.

Die Bestimmung von Pregnandiol und Pregnantriol als bedeutendste urinäre Metabolite von Progesteron bzw. 17α-Hydroxyprogesteron hat klinische Bedeutung für die Zyklusdiagnostik sowie für die Aufdeckung von Steroidbiosynthesestörungen der Nebennierenrinde, wie sie bei verschiedenen Formen des Adrenogenitalen Syndroms vorliegen. Darüber hinaus dient die Pregnantriolbestimmung der diagnostischen Abklärung eines idiopathischen Hirsutismus und einiger maligner Nebennierenrindentumoren mit erhöhten Steroidwerten.

Erniedrigte Pregnantriolwerte haben in keinem dieser Fälle zu verwertbaren Aussagen geführt.

Die Aufgabe war es, durch Kombination bereits bekannter Arbeitstechniken ein Verfahren zu entwickeln, das sich durch seine Praktikabilität für die Routine auszeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wird eine gaschromatographische Methode beschrieben, mit deren Hilfe es möglich ist, Pregnandiol und Pregnantriol aus einer einzigen Urinprobe zu bestimmen. Dem Analysenverfahren liegen im wesentlichen die Methoden von NOCKE (75), KLOPPER und Mitarbeiter (66), CREECH (27) sowie VAN DEN HEUVEL (103) zugrunde.

2. Historische Entwicklung der Pregnandiol-und Pregnantriol-Analytik.

1929 isolierte MARRIAN (73) aus menschlichem Schwangerenharn eine Verbindung, die man nach dem englischen Wort pregnancy = Schwangerschaft - Pregnandiol - nannte. Die Aufklärung seiner Konstitution gelang BUTENANDT (15) 1930 durch die Synthese aus Gallensäuren. Wenige Jahre später fanden BUTENANDT und SCHMIDT (16) durch die Umwandlung von Pregnandiol zu Progesteron die enge Verwandtschaft zu diesem Hormon des Corpus luteum.

1936 berichteten VENNING und BROWNE (104), daß Pregnandiol im Urin nicht in freier Form, sondern als wasserlösliches Natriumsalz der Glucuronsäure vorliegt. Im selben Jahr konnten sie die in vivo-Konversion von exogenem Progesteron in Pregnandiol nachweisen und somit zeigen, daß PD ein Metabolit von Progesteron ist (105). Neben BROWNE und VENNING stellten auch JONES und WEIL (60), sowie SEEGAR und DELFS (91) fest, daß zum einen während der Schwangerschaft die PD-Ausscheidung im Urin ansteigt, zum anderen, daß nach der Implantation des befruchteten Eies die Placenta die Produktion von Progesteron übernimmt, was durch Perfusionsversuche und durch die Untersuchungen des Placentagewebes gesichert wurde.

Die quantitativ - chemischen Bestimmungen von 5ß - Pregnan 3α, 20α- diol gehen auf Arbeiten von VENNING (106) (1936) zurück, wobei das Steroid - Glucuronid aus dem Harn durch Acetonfällung des Butanolextraktes gewonnen und für eine gravimetrische Bestimmung verwendet wurde. Geringere Mengen als 10 mg/l konnten mit der Methode nicht erfaßt werden. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß der Niederschlag noch stark verunreinigt ist und daß das Glucuronid bereits vor seiner Verarbeitung gespalten vorliegen kann und dann nicht erfaßbar ist.

Ein nach MAUGHAN (74) modifiziertes Verfahren war die Bestimmung der aus dem Komplex freigesetzten Glucuronsäuren. Doch alle diese Varianten, wie auch die Adsorption an Benzoesäure nach BEALL (5) waren durch eine zu hoch liegende Nachweisgrenze gekennzeichnet, was diese Methoden natürlich einschränkte. Zwar brachte der Nachweis des Steroids als Barium-Glucuronid - durch WESTPHAL (108),(1944), eine größere Empfindlichkeit, doch ist der Abtrennungsprozeß sehr zeitraubend.
Durch die heiße Säurehydrolyse nach ASTWOOD und JONES (3) kann bei kontinuierlicher Aufnahme in hinzugefügtes Toluol das Steroid aus dem Komplex freigesetzt und nach weiterer Reinigung durch fraktionierte Fällung gravimetrisch bestimmt werden.
Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens lieferte die kolorimetrische Analyse von TALBOT und Mitarbeitern (98), welche das Pregnandiol in Schwefelsäure gelöst als gelben Komplex vermessen haben.
Versuche zur Vereinfachung gingen auf Kosten der Zuverlässigkeit, wie es z.B. die Schnellmethode von SOMMERVILLE, MARRIAN und KELLAR (94) aufweist.
Die enzymatische Hydrolyse nach COHEN (23) mit ß-Glucuronidase liefert im Vergleich zur Salzsäuremethode keine störende Chromogene; dafür ist sie umständlicher und kann durch im Urin anwesende Enzyminhibitoren zu Fehlresultaten führen, weshalb bis vor wenigen Jahren die Verfahren mit Salzsäurehydrolyse überwogen, wie die Methoden von CHAMBERLAIN (20), COX (25), JANSEN (59) und WOTIZ (110) zeigen.
Da PD im Harn auch als Sulfat - Konjugat vorliegt, wurden hier ebenfalls entsprechende Methoden der Hydrolyse entwickelt, wie z.B. enzymatisch mit Sulfatase aus Patelle vulgata nach ROY (89) bzw. durch Solvolyse bei niedrigen Temperaturen nach BURSTEIN (13).
Die Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit gelang mit Hilfe der Adsorptionschromatographie des hydrolysierten Harnes an Aluminiumoxid (56), Celite (22) oder Florisil (77).

Das PT konnte allerdings nicht bei den verwendeten Lösungsmittelsystemen von den Säulen eluiert werden. Beim Vergleich all dieser Verfahren (ohne Gaschromatographie) zeichnete sich die kolorimetrische Methode von KLOPPER und Mitarbeiter (66) als die empfindlichste aus, bei welcher das Diacetat des Pregnandiols verwendet wurde.

Für das Pregnantriol gelten im Prinzip die gleichen Nachweismethoden. Die Schwerpunkte lagen dabei auf dem Gebiet der Papierchromatographie durch Arbeiten von BUSH und Mitarbeitern (14), GOLDZIEHER und NAKAMURA (43), DE COURCY (24), Dünnschichtchromatographie nach STARKA und MALIKOVA (95), OERTEL und GROOT (79) und LISBOA (71) sowie der Säulenchromatographie durch Verfahren von FOTHERBY und LOVE (38), BONGIOVANNI und CLAYTON (9), HERMANN und SILVERMANN (53) und LEON und BULBROOK (70). Eine führende Rolle nehmen auch hier gaschromatographische Methoden ein, wie die Arbeiten u.a. von CREECH (27), OAKS, BONELLI und DIMICK (78), RIVERA, DORFMAN und FORCHIELLI (88), CAWLEY, MUSSER und TRETBAR (19), PANICUCCI und TAPONECO (80) und ZAMORA, PLATTNER und CURTIUS (112).

Im Vergleich zum PD können jedoch aufgrund der Säureempfindlichkeit des PT nur enzymatische Hydrolysen brauchbare Ergebnisse liefern.

Seit wenigen Jahren nun spielt die Gaschromatographie in der Steroidanalytik eine große Rolle. Grundlegend für den Einsatz der Gaschromatographie auf dem Pregnangebiet waren dabei die Arbeiten von BEERTHUIS (6), VAN DEN HEUVEL (103), HORNING (55), SWEELEY (98) und HAAHTI (47).

Zu erwähnen wären noch radiochemische Verfahren, die in den letzten Jahren ebenfalls in steigendem Maße verwendet werden und - weniger für Routinefragestellungen - in Konkurrenz zur Gaschromatographie getreten sind. Dabei werden sowohl ^{14}C - markierte oder tritierte

(ß - Strahler) Steroid-Tracer als auch entsprechend markierte Addukte, z.B. ^{125} J markiert (γ - Strahler) benutzt (113, 84).

Die neueste Meßtechnik auf endokrinologischem Gebiet ist der Radioimmunoassay (RIA), ein Verfahren, das auf Arbeiten von YALOW und BERSON (111) (1960) bzw. HUNTER und GREENWOOD (57) (1962) zurückgeht. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Hormon-Protein-Konjugate - freie Hormone sind als niedermolekulare Substanzen nicht antigen - zunutze, von Antikörpern gebunden, und so quantitativ ähnlich wie bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse bestimmbar zu werden. Der Vorteil liegt einmal in der für radiochemische Methoden typischen hohen Empfindlichkeit und zum anderen in der für immunologische Verfahren hohen Spezifität. Bislang wurden diese Methoden nur aufgrund ihrer aufwendigen Technik nicht für Routineuntersuchungen sondern nur für spezielle Probleme des Steroidstoffwechsels eingesetzt, weil die Nachweisgrenze für radiochemische ebenso wie für das gleichwertige radioimmunologische Verfahren bereits im Picogramm - Bereich liegt, während die Gaschromatographie "nur" Nanogramm - Mengen erfassen kann.

3. Chemie und Physiologie des Progesterons und seiner Metaboliten.

a) Der chemische Aufbau der C 21 Steroide

Pregnandiol ist der Hauptmetabolit des Progesterons (s. Abb. 1), das nach KAUFMANN im reifen Graafschen Follikel zwei Tage vor der Ovulation im Gelbkörper, in der Placenta und in der Nebennierenrinde gebildet wird (63). Eine Pregnandiolbestimmung ist ein Maß bei der Progesteronbildung bei Nichtschwangeren wie bei Schwangeren.

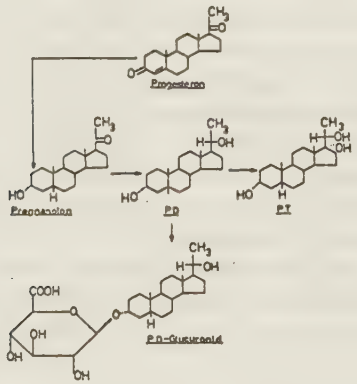
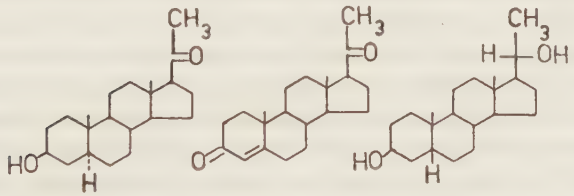


Abb. 1

Progesteron selbst konnte zuerst von FRAENKEL (40) (1903) nachgewiesen werden, indem er zeigte, daß nach Entfernung der Corpora lutea nach der Ovulation beim Kaninchen eine Unterbrechung der Schwangerschaft eintrat, bzw. die Nidation nicht stattfand.
Erst 1934 konnte das Steroid in 4 Arbeitskreisen von SLOTTA (94), BUTENANDT (17), ALLEN (1) und HARTMANN (52) gleichzeitig rein isoliert werden; BUTENANDT und Mitarbeiter (17) berichteten nämlich

von der Isolierung zweier physiologisch wirksamer Diketone und eines inaktiven Hydroxyketons. Bei den Diketonen handelte es sich um das Progesteron, das in zwei polymorphen Modifikationen vom Fp.129, 5° C (α-Form) und Fp. 122 ° C (ß-Form) in Rauten bzw. flachen Leisten kristallisierte. Aufgrund der ähnlichen Summenformel ($C_{21}H_{30}O_2$) bzw. ($C_{21}H_{34}O_2$) beim Hydroxyketon und des gemeinsamen Auftretens schloß man nicht nur auf eine biogenetische sondern auch auf eine strukturelle Ähnlichkeit (Abb. 1 a).



5α-Pregnan-3ß-ol-20-on | Progesteron | 5ß-Pregnan-3α, 20α-diol

Abbildung 1 a

b) Bedeutung des Progesterons für den Zyklus der Frau und die Schwangerschaft.
In jedem Zyklus wird die Uterusschleimhaut der Proliferationsphase in die der Sekretionsphase transformiert und das Endometrium so auf die Implantation eines befruchteten Eies vorbereitet. Wenn eine Befruchtung stattgefunden hat, werden einmal weitere

Ovulationen unterbunden, zum anderen die Funktionalität des Uterus zur Entwicklung des Embryos aufrechterhalten: Das Myometrium wächst und die Kontraktionsfähigkeit der Uterusmuskulatur (allgemein: Die Verminderung des Tonus der glatten Muskulatur) nimmt ab. Dabei wirken Östrogene synergistisch. Progesteron bewirkt im einzelnen eine Vermehrung von Glucagon, Glucoproteiden, Mucopolysacchariden, Lipiden; zudem wird die Zellatmung und die aerobe Glycolyse erhöht. Maximale Werte erreicht der Progesteronspiegel in der Lutealphase am 7. - 8. Tag nach der Ovulation. Die Werte liegen maximal bei 50 ng/ml Blut. Danach nimmt die Progesteronproduktion des degenerierten Corpus luteum bis zur Menstruation ab (12). Nach einer stattgefundenen Befruchtung liefert das Corpus luteum jedoch während der ganzen Schwangerschaft Progesteron. Nach KAUFMANN (63) findet man in der ersten Hälfte der Schwangerschaft größere Streuungen der PD-Werte, weniger dagegen in der zweiten Hälfte. Im Verlauf der Gravidität werden bei gleichbleibender Progesteronkonzentration im Blut von der Placenta entsprechend dem zunehmenden Placentagewicht erhöhte Pregnandiolmengen produziert. Das Hormon Progesteron selbst konnte bis vor wenigen Jahren auch im Urin von Schwangeren nicht nachgewiesen werden. Ersten Nachweis für eine geringfügige Ausscheidung des Hormons mit dem Urin erhielten ISMAIL und HARKNESS (58) durch den Einsatz der GC, während noch 1965 DROSDOWSKI und Mitarbeiter (34) nur einen "response" an der Nachweisgrenze erhielten und den Gehalt an Progesteron im Urin auf 0,6 bis 11 µg/24 h schätzten.
Im Blut wurde das Hormon mit dem HOOKER-FORBES-Test (54) zuerst nachgewiesen. Diese im Jahre 1947 erarbeitete Methode wurde deswegen so bedeutend, weil mit ihr kleinste Mengen von Progesteron erfaßt werden konnten. Die Bestimmung basiert auf der charakteristischen Wirkung von intrauterin appliziertem Progesteron

auf die Stromakerne des Endometriums kastrierter Mäuse. Die Nachweisgrenze lag bei 100-200 ng, für die damalige Zeit eine enorm hohe Empfindlichkeit.

c) Biogenese und Metabolismus des Progesterons.

Progesteron ist das wichtigste natürlich vorkommende Gestagen und besitzt daneben große Bedeutung als Intermediärprodukt der vom Cholesterin ausgehenden Biosynthese der Cortico-Steroide, Androgene und Östrogene.
Die Biosynthese der Steroide verläuft nach Ansicht vieler Autoren (35,87) im Ovar, Placenta, Nebenniere und auch Testes übereinstimmend, unabhängig vom Produktionsort und ihrer spezifischen Wirkung. Nur aufgrund der unterschiedlichen Enzymmuster ergeben sich in der Produktionsrate quantitative Unterschiede.
Die einzelnen Syntheseschritte wurden in den letzten Jahren intensiv mit Hilfe von Perfusions- und Inkubationsexperimenten unter Verwendung markierter Steroide erforscht. Der bei allen inkretorischen Drüsen ähnliche Aufbau der Steroidhormone mit spezifischen Enzymsystemen erklärt sich bei Ovarien, Testes und NNR dadurch, daß sie im Embryonalstadium gemeinsam aus der Keimleiste entstanden sind.
Abbildung 2 zeigt schematisch Biogenese und Metabolismus von Progesteron im Organismus des Menschen.
BLOCH (7) nahm an, daß die Progesteron-Biosynthese beim Acetat seinen Ursprung nimmt (s.Abb.2) und postuliert als nächsten Schritt die Synthese von Cholesterin. Die Umwandlung von Cholesterin in Harn - Pregnandiol konnte er schon 1945 mit der deuterierten Ausgangssubstanz nachweisen (8).
3ß-Hydroxy-5-Pregnen-20-on ist der unmittelbare Precursor von Progesteron.

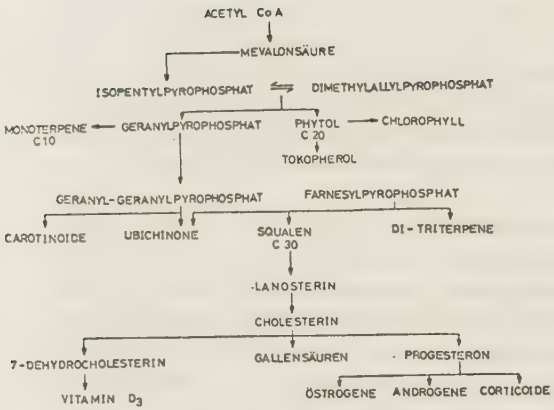


Abbildung 2

Bemerkenswert an der Steroidbiosynthese ist, daß die Östrogene der Keimdrüsen aus Androgenen gebildet werden, wie Abbildung 3 zeigt. Ein markantes Beispiel für eine Störung in der Biosynthese ist das Stein-Leventhal-Syndrom, wo nämlich auf Grund eines Enzymdefekts die Östrogenbildung aus androgenen Vorstufen gestört ist.

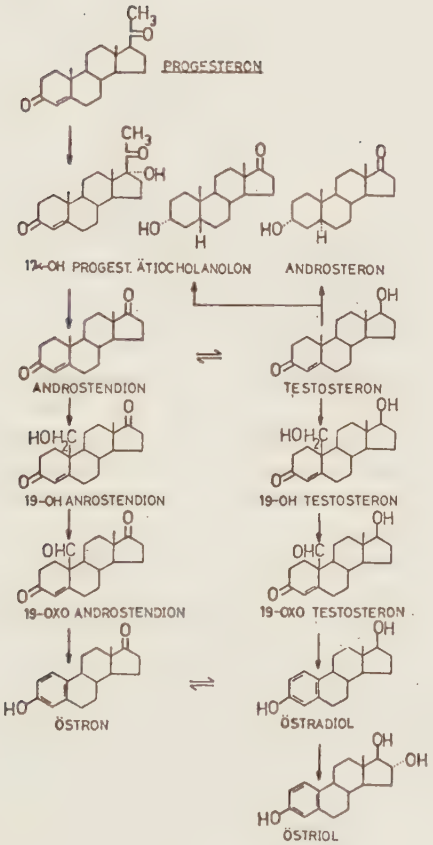

PROGESTERON
17α-OH PROGEST.
ÄTIOCHOLANOLON
ANDROSTERON
ANDROSTENDION
TESTOSTERON
19-OH ANROSTENDION
19-OH TESTOSTERON
19-OXO ANDROSTENDION
19-OXO TESTOSTERON
ÖSTRON
ÖSTRADIOL
ÖSTRIOL

Abbildung 3

Die einzelnen Bereiche des Ovars sind (nach UFER, (101)) während des Cyclus zu unterschiedlichen Steroid-Syntheseprodukten fähig. Die Gestagene werden vorwiegend im Corpus luteum und im sprungreifen Follikel gefunden; Androgene treten vorwiegend als Δ^4 - Androstendion in Rinde, Mark und Hilus auf; Östrogene wurden als Östron und Östradiol in der Follikelflüssigkeit und auch in den Corpora lutea nachgewiesen.
Vom Ovar unterscheidet sich die Placenta in ihrer Biosyntheseleistung: Östrogene können nicht in der späten Schwangerschaft aus Cholesterin bzw. Acetat synthetisiert werden, sondern nur über den Precursor DHEA - Sulfat fetoadrenalen Ursprungs. Als plazentares Östrogen wird hauptsächlich Östriol sezerniert.
In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß neben der Leber Nebenniere, Gonaden, Placenta, Darmwand, Aorta, Nervengewebe und die Haut zur Cholesterinsynthese befähigt sind. Dabei ist noch offen, ob Cholesterin ein notwendiges Zwischenprodukt ist oder ein direkterer Weg vom Acetat zum Steroid existiert. Nur die Tatsache konnte bislang nachgewiesen werden, daß der erste Weg über Cholesterin dominiert.
Ein wichtiger Syntheseort für Steroide ist die Nebennierenrinde (NNR). In der Zona fasciculata (s. Abb.4) läuft unter dem Einfluß des Corticotropin-Releasing-Hormon aus dem Hypothalamus (HTh) über das im Hypophysenvorderlappen (HVL) ausgeschüttete ACTH vom Cholesterin ausgehend folgende Synthesekette ab:

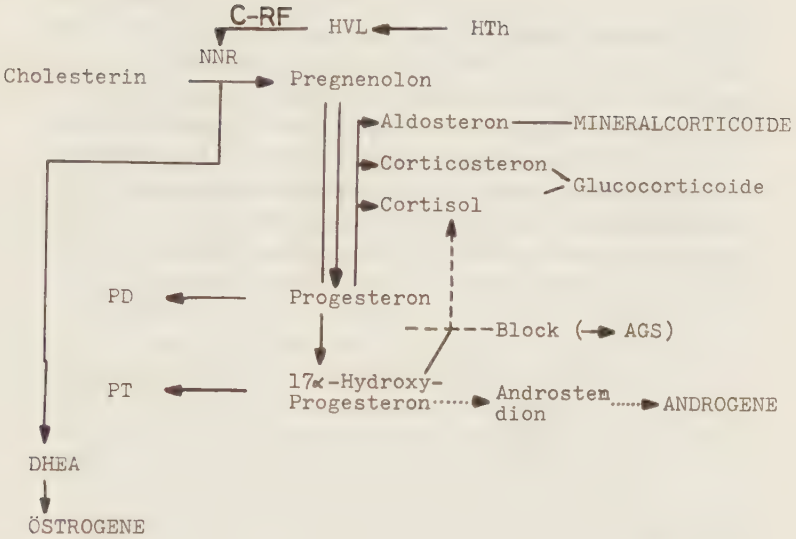


Abbildung 4

(Modifiziert nach: C.H. GRAY (45))

Cortisol entsteht dabei als Haupt-Endprodukt, während Pregnandiol und -triol als wichtige Metabolite auftreten. Schon vor über 30 Jahren wurden die Beziehungen zwischen NNR und Pregnandiolausscheidung erkannt, als nämlich 1941 durch ENGEL und Mitarbeiter (37) aus Männerharn PD isoliert und in der Folgezeit auch bei ovarektomierten Frauen PD im Urin festgestellt wurde (KLOPPER, STRONG und COOK (67)).

Δ 5 Pregnenolon ist, wie Abb. 5 zeigt, die zentrale Substanz in der Biosynthese der Steroide. Alle Gewebe, die Steroidhormone bilden, enthalten Enzyme, die

Pregnenolon zur Progesteron umwandeln. Allgemein gilt, daß die Fähigkeit der endokrinen Drüsen, strukturspezifische Steroidhormone zu bilden, nur durch das Vorherrschen einzelner Enzymsysteme mit charakteristischer Substratspezifität in den jeweiligen Geweben zu erklären ist. Die Biosynthese wird hauptsächlich durch die Parameter Substratzugänglichkeit, der Existenz von Kofaktoren, der Reaktionskinetik und der Sekretionsrate bestimmt.

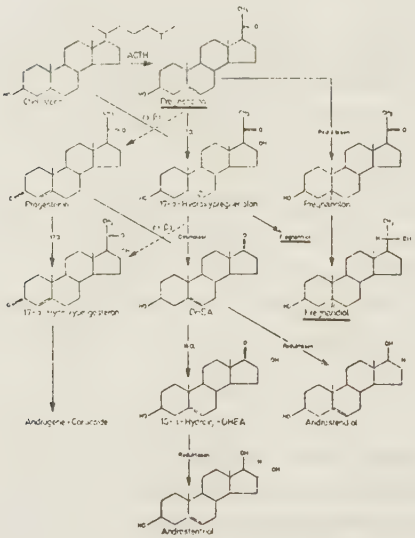
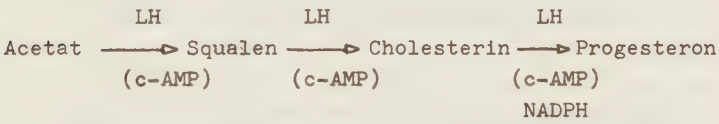


Abbildung 5

Darüberhinaus wird der Vorgang der Biosynthese vom Vorhandensein der entsprechenden tropen Hormone reguliert. Dies erkennt man an einer bald einsetzenden Inaktivitätsatrophie der peripheren Drüsen nach dem Ausbleiben der HVL - Hormone.
Die Steroidbiosynthese wird durch Gonadotropine an verschiedenen Stellen nach EIK-NES und NOCKE (36,76) beeinflußt. Die Freisetzung von LH im HVL ruft beim Menschen einmal eine Ovulation hervor, zum anderen wird die Bildung des Corpus luteum angeregt, was sich in veränderter Östrogen-, PD- und PT-Ausscheidung zeigt. Nach K. SAVARD und B.F. RICE (90) nimmt man an, daß das Progesteron im Corpus luteum aus einem kleinen Pool steroidbildenden Cholesterins entsteht, dessen Synthese und Umwandlung unter LH-Kontrolle steht, wie folgendes Schaubild zeigt:

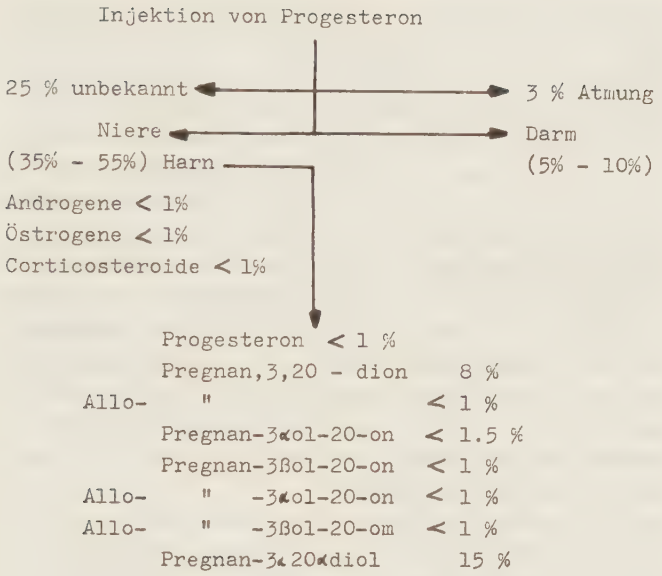


Die Wirkung der Gonadotropine geht nach Meinung der Autoren nur noch bis zur Synthese von Δ 5-Pregnen-3ß-ol-20-on, während die folgenden Syntheseschritte von Gonadotropinen nicht beeinflußt werden.

Abbau und Ausscheidung der Gestagene.

Ähnlich wie der Aufbau verläuft der Abbau und die Ausscheidung der Steroide über verschiedene biochemische Schritte. Die metabolische Clearance von Progesteron entspricht der doppelten Leberdurchblutung. Demnach muß der Abbau außerhalb der Leber genau so groß sein wie in der Leber, was in Stoffwechselversuchen einzelner Gewebeabschnitte (Muskelgewebe, Lunge, sekretorischem Endometrium, Myometrium) von SWEN und Mitarbeiter (97) nachgewiesen werden konnte.

Wenn die ins Blut sezernierten Steroidhormone nicht aufgrund ihres lipophilen Charakters im Fettgewebe gespeichert, bzw. von den oben erwähnten Erfolgsorganen verstoffwechselt werden, so erfolgt hauptsächlich der Abbau zu hormonal unwirksamen Metaboliten in der Leber, die dazu mit den spezifischen Enzymen (Oxydoreduktasen, Hydroxylasen, Acyltransferasen) ausgestattet ist.
Durch radioaktiv markiertes Progesteron konnte von PLOTZ (85) nachgewiesen werden, daß das Hormon sehr schnell aus der Blutbahn eliminiert wird und zum größten Teil ins Gewebe diffundiert, wobei der lipophile Charakter des proteingebundenen Komplexes für die Verteilung maßgebend ist. Der größte Teil ist in der -Globulin- und Albumin-Fraktion.
Die "turn-over"-Zeit, die Zeit, in der das in den Blutkreislauf ausgeschüttete Progesteron eliminiert wird, beträgt nach PEARLMAN (82) (1957) etwa 3,3 Minuten.
Die Arbeitsgruppe von PEARLMAN (83) konnte 1954 zeigen, daß das Enzym 3ß-ol-Dehydrogenase das Δ 5 Pregnenolon in Progesteron umwandelt. Eine neuere Arbeit von LAURITZEN (69) erbrachte eine genaue Aufschlüsselung der Verteilung und Ausscheidung von Progesteronmetaboliten beim Menschen nach Injektionen von markiertem Progesteron, wie folgende Tabelle zeigt:



Der Abbau des Progesterons beginnt mit der Reduktion des ungesättigten Ringes A durch die spezifische 4 Dehydrogenase unter Bildung von 5α und 5ß-Isomeren des Pregnan 3,20-dions. Die weitere Reduktion der 3-Ketogruppe ergibt zwei Pregnan-3-ol-20-one, von denen das 5ß-Pregnan 3α-ol-20-on Isomere überwiegt. Bei der Reduktion der zweiten Ketogruppe entsteht neben anderen Isomeren als Hauptmetabolit 5ß-Pregnan 3α,20α, -diol, das "Pregnandiol". Die in den einzelnen Abbauschritten entstehenden hydrophileren Metabolite müssen noch durch die Leber zwecks besserer Ausscheidbarkeit über Galle und Harn ähnlich den Phenolen und anderen cyclischen Alkoholen mit Glucuronsäure bzw. Schwefelsäure konjugiert werden.
Die Ausscheidung der PD-Glucuronide überwiegt die der Sulfate ca. fünffach (93).

Neben den in 6- und 16-Stellung hydroxylierten Metaboliten des Progesterons sind vor allem die 17-Hydroxy-Pregnane, zu denen das Pregnantriol gehört, noch von besonderer Bedeutung, da diese Substanzen, wie schon erwähnt, eine unmittelbare Rolle bei der Corticoid-, Androgen- und Östrogensynthese spielen.

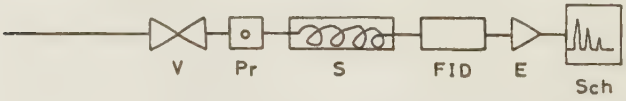
Wie aus der Abbildung 4 ebenfalls leicht zu ersehen ist, liefern PT-Werte Aussagen über die Funktionalität der Nebenniere. So ist 5ß-Pregnan-3α, 17α, 20α-triol beim AGS, neben Pregnantriolon, der wichtigste Metabolit. Durch Blockierung der 21 Hydroxylase wird aus 17α-Hydroxy-Progesteron Cortisol unzureichend ausgeschieden, wodurch der Regelkreis Cortisol/ACTH gestört und vermehrte Androgene (→ 17-KS) und Pregnantriol produziert werden.
Der Zusammenhang zwischen PT und adrenalen Erkrankungen, besonders Tumoren der Nebenniere wurden schon 1937 von BUTLER und MARRIAN (18) diskutiert.
Von den vier möglichen Isomeren ist 5ß-Pregnan 3α, 17α,20α-triol der Hauptmetabolit. Während die ß-Form dieses Steroids, wie schon erwähnt, bei Erkrankungen der Nebenniere seit längerem bekannt ist, ist das 5-α-Isomere bei gesunden Versuchspersonen in der Lutealphase durch COX (26) (1959) relativ spät aufgefunden worden.
Im Harn tritt es als Glucuronid und als Sulfat auf, wobei die Glucuronide auffallend um das 10 - 45fache (93) überwiegen.
Pregnandiol und Pregnantriol werden nicht in einem konstanten Verhältnis zueinander ausgeschieden.
In der Follikelphase und bei Männern liegt die Pregnandiolausscheidung etwa zweimal, in der Lutealphase etwa viermal so hoch wie die des Pregnantriols.
Das ausgeschiedene Pregnantriol hat ebenfalls einen adrenalen und einen gonadalen Anteil sowie einen

zyklusartigen Verlauf, d.h., ein steiler Anstieg der Ausscheidungsrate in der Zyklusmitte auf das 2-3fache. Etwa 6-8 Tage nach der Ovulation - 2 bis 4 Tage vor dem Maximum der Pregnandiolausscheidung - liegen die höchsten Pregnantriolwerte, um dann bis zur Menstruation wieder abzufallen.
Ebenso niedrige Werte finden sich nach Unterdrückung der Ovarfunktion durch Ovulationshemmer (39).
Während der Schwangerschaft liegen die PT-Werte über denen der Lutealphase, max. 1,5 mg/24 h, mit einem Maximum von 5,0 mg/24 h im letzten Trimenon (53).

B Experimenteller Teil

4. Grundlagen und Beschreibung der gaschromatographischen Bestimmung.

Den Wert der Gaschromatographie in der Steroidanalytik erkennt man an der Vielzahl der Publikationen, die in den letzten Jahren erschienen sind.
KAISER (62) begrenzt die Anwendung gaschromatographischer Verfahren auf Stoffe, die normal verdampft werden können oder sich in wiederholbarer Weise in stabile dampfförmige Spaltprodukte zersetzen lassen. Ferner ist sie auf Stoffe anwendbar, die ursprünglich weder verdampft noch in der genannten Weise zersetzt werden können, aber durch geeignete chemische Reaktionen in Stoffe mit den oben genannten Eigenschaften umgewandelt werden können.
Anhand des Block-Schemas läßt sich die benutzte"Entwicklungstechnik" der Flüssig-Gaschromatographie (LGC) oder Verteilungs-Gaschromatographie leicht beschreiben:



V = Ventil des Strömungsreglers
Pr = Probengeber
S = Säule (temperierbar)
FiD = Detektor
E = Elektronik
Sch = Schreiber

Über das Ventil (V) des Strömungsreglers wird ein wichtiger Parameter des Gaschromatographen bestimmt: Die Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases.
Als Trägergase dienen üblicherweise gereinigter Stickstoff, aber auch Wasserstoff und Edelgase. Neben dem

gemeinsamen inerten Charakter unterscheiden sie sich primär im Molekulargewicht. Es gilt allgemein, daß mit steigendem Molekulargewicht des Trägergases die Trennleistung ansteigt.
Der Gasdurchfluß hat direkten Einfluß auf die Verweilzeit der Substanzen in der Säule (Retentionszeit) und somit auch auf die qualitative Identifizierung anhand des Chromatogramms. Die Strömung des Trägergases und die Retentionszeit verhalten sich linear zueinander.

Über den Probengeber (Pr) wird die Substanz in den Chromatographen gegeben und gelangt durch das gleichmäßig strömende Trägergas in die temperierte, mit Adsorptionsmittel gefüllte oder mit Trennflüssigkeit benetzte Säule (S) aus Glas oder Stahl.
Bei diesem kontinuierlichen Stofftransport durch die Trennsäule bewirken die verschiedenen Wandergeschwindigkeiten der einzelnen Substanzen im Stoffgemisch eine Trennung. Die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten beruhen - wie bei jedem chromatographischen Vorgang - auf der Verteilung einer Substanz zwischen zwei Phasen, von denen die eine stationär in der Trennsäule untergebracht ist, während die andere als sogenannte mobile Phase (z.B. Stickstoff als Trägergas) die Trennsäule durchströmt und so den Transport der einzelnen Substanzen bewirkt.
Der Spezifikation der Säulenfüllung liegt die Überlegung zugrunde, daß i.a. mit sinkender Menge an Trennflüssigkeit pro Menge an Trägermaterial die Trennleistung auf Kosten der Belastbarkeit steigt. Weiterhin gilt, daß mit sinkender Korngröße des Trägermaterials zwar die Trennleistung steigt; allerdings auch der unerwünschte Gasdruck in der Säule und die Retentionszeiten. Für maximale Trennleistung hat sich der Korngrößenbereich von 125 - 150 µ, entsprechend 120-100 mesh, bei möglichst engem Siebschnitt herausgestellt (10 bis 20 mesh).

Maximale Trennleistungen ergeben sich - abgesehen von der Säulenfüllung - nicht nur aus einem optimalen Trägergasdurchfluß, sondern auch aus der optimal eingestellten Temperatur, bei der die Säule arbeitet. Bei einer Temperatursteigerung verhalten sich die einzelnen Substanzen entsprechend der Erhöhung ihres eigenen Dampfdruckes, d.h. ihre Wanderungsgeschwindigkeit nimmt exponentiell zu. Bei zu hoher Temperatur werden die Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten zu gering, die aufgetrennten Komponenten erscheinen am Detektor (FID) in zeitlich zu dichter Reihenfolge und werden auf dem Schreiber (Sch) nicht mehr eindeutig unterschieden, d.h. die Trennung wird schlechter.
Durch Temperatursenkung können zwar die Trennungen verbessert werden, dafür verlängern sich die Retentionszeiten. Zwischen diesen Extrema liegt das Temperaturoptimum, das erarbeitet werden muß.
Neben der Säulentemperatur und der Trägergasgeschwindigkeit hat die Zusammensetzung der Säulenfüllung bedeutenden Einfluß. Als allgemeine Kriterien für gaschromatographische Trennsäulen gelten: hohe Trennleistung, kurze Analysenzeit und hohe Belastbarkeit. Darüber hinaus sollen auch empfindliche Substanzen unzersetzt getrennt werden. Denn gerade Steroide mit mehreren stark funktionellen Gruppen - besonders PT mit einer 17,20 - Glycolgruppe - unterliegen der Zersetzung bei höheren Temperaturen. Die Vielzahl der verwendbaren stationären Phasen unterliegen den gleichen physikochemischen Gesetzen, die die Wechselwirkung zwischen ihnen und den einzelnen zu analysierenden Substanzen ausmacht: London-, Keesom-, Debye - und chemischen Bindungskräften. Je stärker die Kräfte wirksam werden können, desto länger sind die Retentionszeiten. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren und der Polarität der zu analysierenden Komponenten erhält man Auskunft über die Selektivität der Säulenfüllung. Von der Säule (S) gelangen die getrennten Kompo-

nenten zum Detektor, im vorliegenden Fall zum Flammen - Ionisationsdetektor (FID). Beim FID wird die elektrische Leitfähigkeit einer Wasserstoff-Flamme gemessen. Am Ende der Säule wird zum Stickstoff als Trägergas noch Wasserstoff sowie synthetische Luft über ein Düsensystem zur Verbrennung zugegeben. Die Knallgas-Flamme erzeugt bei einem Feld von ca. 200-300 V einen Grundionisationsstrom von ca. 10^{-11} A. Nach KAISER (62) gibt es einen unteren Ionenstrom, der aufgrund des thermischen Rauschens einiger Bauteile meßtechnisch direkt nicht unterschritten werden kann; er liegt bei 10^{-15} A. Die Konzentration Null einer zu messenden Komponente bzw. der Substanzfluß Null sind praktisch nicht erreichbar, weil jede mobile Phase eine endliche Reinheit hat.
In Verbindung mit einem Schreiber (Sch) liefert der Detektor ein Gaschromatogramm, das die Retentionszeit und die jeweils herrschende Konzentration der zu untersuchenden Substanz als Differential ("Peak") anzeigt. Während die Retentionszeiten der einzelnen Peaks zur qualitativen Identifizierung dienen, so ermöglicht die Integration der Fläche unter einem Peak - bezogen auf einen Standard - eine quantitative Erfassung der jeweiligen Komponente.

5. Die Durchführung der Analysen.

a) Reagenzien und apparative Ausrüstung:

Toluol p.a.	(Merck, Darmstadt)
NaOH (Plätzchen) p.a.	" "
Standardacetat-Puffer p.a. pH 4,62	" "
Essigsäure (99-100%-ig) p.a.	" "
NaCl p.a.	" "
Pregnandiol p.a.	(Serva, Heidelberg)
Pregnantriol p.a.	" "
OV-1, QF 1, XE 60	" "
Gas Chrom Q, 100-120 mesh	" "
Testosteron reinst	(Fluka, Schweiz)

Helix pomatia-Extrakt mit 100 000 E ß-Glucuronidase (Fischmann)

Helix pomatia-Extrakt mit 800 000 E Sulfatase (Roy) (Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers, Frankreich)

MSTFA = N-Methyl-N-Trimethylsilyl-trifluoracetamid

TMCS = Trimethylchlorsilan (beide Macherey & Nagel, Düren)

Glasgeräte:

100 ml Zentrifugenröhrchen
50 ml Erlenmeyerkölbchen mit Schliff und Stopfen
100 ml Scheidetrichter
Pipetten, Meßzylinder, Meßkolben

Apparative Ausrüstung:

Brutschrank mit Zeitschaltuhr
pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen)

Rotationsverdampfer (Büchi)
Zentrifuge
Gaschromatograph (Beckmann GC-4; Hewlett-Packard 5830 A mit GC-Terminal 18850 A)

b) Herstellen der Säulenfüllung.

In einem 100 ml Rundkolben werden 200 mg OV1 (Serva) in 50 ml $CHCl_3$ p.a. bei 50 ^{o} C am Rotavapor ohne Anlegen eines Vakuums zur Lösung gebracht. Danach werden 10 g Gas Chrom Q, 100-120 mesh, zu der warmen Lösung gegeben und das Lösungsmittel langsam im Vakuum entfernt.
Das Füllmaterial wird untern Anlegen eines Wasserstrahlpumpenvakuums und leichtem Klopfen in die Glassäule gebracht. Die beiden Säulenenden werden mit etwas silanisierter Glaswolle verstopft. Anschliessend wird die Säule bei langsam steigenden Temperaturen unter N_2-Durchfluß (z.B. Temperaturprogramm 3^{o} C/Min.) bis auf ca. 30^{o} - 40^{o} C über der normalen Arbeitstemperatur aufgeheizt und nach Erreichen der Maximaltemperatur (bei OV1 ca. 300^{o} C) für 12^{h} - 24^{h} ausgeheizt. Erst nach abgeschlossenem Ausheizen wird die Säule an den Detektor angeschlossen.

c) Hydrolyse.

Das Volumen des gesamten 24-Stunden-Urins wird in einem Meßzylinder gemessen. Mit einer Vollpipette werden 15 ml des gut durchmischten Urins in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend werden 2,75 ml Standardacetat-Pufferlösung hinzugegeben (pH 4,62) und durch tropfenweise Zugabe von Essigsäure (99-100 %) wird die Lösung auf einen pH-Wert

von 4,50 (4,30 bis 4,70) eingestellt.

Danach wird 1 ml standardisierter Helix Pomatia-Extrakt mit 15000 Fishman-Einheiten ß-Glucuronidase und 120000 Roy-Einheiten Sulfatase zugegeben und nach dem Umschütteln die Hydrolyse über 8 Stunden bei 37 ° C im Brutschrank durchgeführt.

d) Extraktion.

Nach Beendigung der Hydrolyse können die Kölbchen eingefroren oder unmittelbar zur weiteren Aufarbeitung verwendet werden. Der abgekühlte, hydrolysierte Urin wird quantitativ in einen 100 ml Scheidetrichter überführt und 2-mal mit je 25 ml frisch destilliertem Toluol ausgeschüttelt, wobei die freien Steroide extrahiert werden. Die Toluolphasen werden vereinigt und mit 15 ml eines Gemischs aus 25 % NaCl und 1 N NaOH (1:1) gewaschen. Die wässrige Phase wird verworfen. Bei schlechter Phasentrennung wird das Gemisch in 100 ml Zentrifugenröhrchen 15 Min. bei ca. 3000 UpM zentrifugiert.
Nach Abtrennen der wässrigen Phase wird die organische Phase zur völligen Entfernung der Natronlauge 2-mal mit je 15 ml destilliertem Wasser gewaschen. Der Toluolextrakt wird in 50 ml Rundkolben überführt und mit 1 ml Testosteronstandardlösung (30 µg/ml) als innerem Standard für die Gaschromatographie versetzt.

e) Silylierung und Gaschromatographie.

Der mit Testosteron versetzte Toluolextrakt wird am Rotationsverdampfer bei 45° C Badtemperatur zur Trockene gebracht und mit 50 µl MSTFA, das 1 % TMCS

als Katalysator enthält, versetzt.
Zur vollständigen Silylierung wird für 15 Minuten auf 40° C im Trockenschrank erwärmt und binnen 2 Stunden am Gaschromatographen gemessen.
Es werden jeweils 1/ul mit einer Hamilton-Spritze injiziert. Verwendet wird eine 3m Glassäule, I.D. = 1,6 mm mit 2 % OV1 auf Gas Chrom Q 100-120 mesh (säure- und alkaligewaschen, silikonisiert). Die Injektortemperatur beträgt 245 ° C, die Säulentemperatur 245° C, die Detektortemperatur (FID) 260° C. Der N_2-Trägergasdurchfluß wird auf 45 ml/Min. eingestellt.

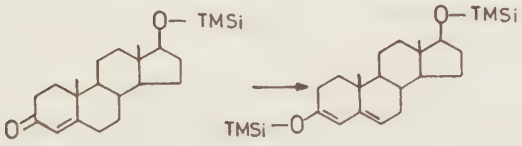
C Ergebnisse

Es hat sich für die Analytik der neutralen C 21-Steroide als vorteilhaft erwiesen, diese nach HAMMOND und LEACH (51) in ihre Trimethylsilyläther-Derivate überzuführen. Durch die geringe Polarität dieser Verbindungen - sie verhalten sich nahezu wie Kohlenwasserstoffe und sind gut flüchtig - ergeben sich kürzere Retentionszeiten mit guten Trennungen bei niedrigen Temperaturen.
Das von uns benutzte MSTFA (= N-Methyl-N-Trimethylsilyl-trifluoracetamid) F_3 C-CO-N$\langle^{CH_3}_{Si}\rangle$ $(CH_3)_3$ ist das flüchtigste aller Trimethylsilylamide (33). Gegenüber älteren Silylierungsmitteln zeichnet es sich durch hohe Silylierungskraft und durch ein geringeres Verschmutzen des Detektors mit SiO_2 aus. Die Reaktion verläuft nach folgendem Mechanismus:

$$X\text{-}H + F_3C\text{-}CO\text{-}N\langle^{Si(CH_3)_3}_{CH_3} \rightleftharpoons X\text{-}Si\ (CH_3)_3 + F_3C\text{-}CO\text{-}N\langle^{H}_{CH_3}$$

Dabei ist das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Endprodukte verschoben. Zur Derivatisierung genügt kurzzeitiges Erhitzen (15 Min. bei 40° C) unter Verwendung von katalytischen Mengen an TMCS (Trimethylchlorsilan). Zu beachten ist, daß Steroid-Trimethylsilyätherderivate sehr leicht durch Spuren von Feuchtigkeit hydrolysiert werden. Normalerweise ist dadurch eine eindeutige Auswertung der Chromatogramme erschwert, wenn nicht gar unmöglich gemacht.
Nur durch Verwendung eines inneren Standards, wie mehrere Autoren zeigten (27,28) - wir verwendeten Testosteron - kann die Gefahr einer Zersetzung oder einer nicht vollständigen Derivatisierung ausgeschaltet bzw. rechtzeitig erkannt werden.
Hier wurde außerdem festgestellt, daß zu langes Erhitzen und Stehenlassen der Probe zu einer Umlagerung des als inneren Standards benutzten Testosterons führen kann, was durch GC/MS-Messungen belegt wurde. Dabei wird die Ketogruppe des

Testosterons enolisiert (42,46) und ebenfalls silyliert:



Die von uns benutzte Säulenfüllung - 2 % OV 1 auf das Gas Chrom Q 100-120 mesh - ist ein Dimethylpolysiloxan mit ähnlichen Trenneigenschaften wie der Silikongummi SE 30, verbunden mit einer höheren Temperaturstabilität.
(OV 1-Säulen können bis 300° C betrieben werden. OV 1 löst sich in Chloroform, Hexan und Toluol und hat ein Molekulargewicht von über 10^6).

a) Berechnung der Ergebnisse.

Die jeweiligen Testosteron-, Pregnandiol- und -triol-Peaks werden anhand der Retentionszeiten eines authentischen Standardgemisches mit p.a. - Substanzen identifiziert.
Die injizierte Menge von Pregnandiol und Pregnantriol werden durch Berechnung der Peakfläche aus dem Produkt von Höhe mal Halbwertsbreite, bezogen auf den internen Testosteron-Standard, berechnet.
Dafür wurden folgende Gleichungen benutzt:

1) F = Peakfläche = Höhe mal Halbwertsbreite

2) $\frac{F \times St \times V}{F_T \times 15} = M$

St = Menge des Standards (30 µg Testosteron)
V = Volumen des 24^h Urins (ml)
M = Menge (mg) /24^h
F = Peakfläche
F_{PD} = Peakfläche von PD

Die Auswertung am Hewlett Packard 5830 A erfolgt durch elektronische Integration (s. Abb. 6). Abbildung 6 zeigt zwei Chromatogramme auf dem HP 5830 A. Chromatogramm A ist eine Urinanalyse und B zeigt den entsprechenden Lauf mit analysenreinen Referenzsubstanzen. RT und EXP RT sind die Soll- und Istwerte der Retentionszeiten. Sie liegen für T, PD, PT bei 3,02; 3,91 bzw. 5,48 Minuten. Der letzte Ausdruck AMT gibt die Auswertung in µg/24 Stunden bezogen auf den inneren Testosteron-Standard (30 mg/l) an. Die beiden Chromatogramme zeigen deutlich die gute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten.

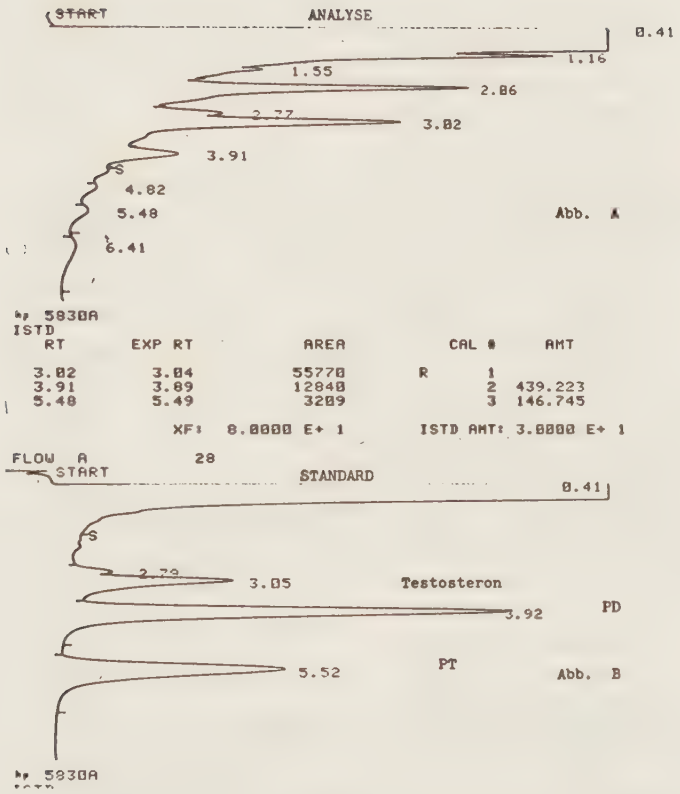

START
ANALYSE
0.41
1.16
1.55
2.86
2.77
3.82
3.91
4.82
5.48
6.41
Abb. A
5830A
ISTD
RT EXP RT AREA CAL # AMT
3.82 3.84 55770 R 1
3.91 3.89 12840 2 439.223
5.48 5.49 3209 3 146.745
XF: 8.0000 E+ 1 ISTD AMT: 3.0000 E+ 1
FLOW A 28
START
STANDARD
0.41
2.79
3.05
Testosteron
3.92
PD
5.52
PT
Abb. B
5830A

Abbildung 6

Tabelle 1
(Relative Retentionszeiten der TMSi-Derivate)

Testosteron	1,00
17α-Methyl-Testosteron	0,92
5α-Androstan-3-ol-17-on (Androsteron)	0,68
5-Androsten-3ß-ol-17-on (DHEA)	0,79
5-Androsten-3ß, 17ß-diol	0,92
5ß-Androstan-3ß-ol-17-on (Ätiocholanolon)	0,66
5α-Androstan-3α-oL-11,17-dion	0,80
5ß-Androstan-3α-ol-11,17-dion (11-Keto-Ätiocholanolon)	0,80
5α-Androstan-3α,11ß-diol-17-on (11-Hydroxy-Androsteron)	0,96
5ß-Pregnan-3α, 17α, 20α-triol-11-on	2,21
5ß-Pregnan-2 -ol-3,20-dion	1,85
5-Pregnen-3ß-ol-20-on (Pregnenolon)	1,15
5-Pregnen-3ß, 17α-diol-20-on	1,55
4-Pregnen-2oß-ol-3-on	1,57
5α-Pregnan-3α, 20α-diol (Allopregnandiol)	1,25
5ß-Pregnan-3α,20α-diol (PD)	1,29
5α-Pregnan-3ß,20ß-diol	1,44
5-Pregnen-3ß,20ß-diol	1,41
5ß-Pregnan-3ß,20α-diol	1,23
5ß-Pregnan-3α,20ß-diol	1,20
5ß-Pregnan-3ß,20ß-diol	1,19
5ß-Pregnan-3α,17α,20α-triol (PT)	1,76

Tabelle 1 gibt die relativen Retentionszeiten (R_T-Werte) der TMSi - Derivate (bezogen auf Testosteron = 1,00) wieder. Säulenbedingungen: 3 m x 1,6 mm Glassäule mit 2 % OV 1 auf Gas Chrom Q 100-120 mesh (säure- und alkaligewaschen, silikonisiert).
Der N_2-Trägergasdurchfluß wird auf 45 ml/min eingestellt. Die Temperaturen betragen: Einspritzblock 245° C, Säulenofen 230° C, FID 260° C.

6. Prüfung der Zuverlässigkeitskriterien.

Zur Überprüfung der Brauchbarkeit der Analysenmethode werden die allgemeinen üblichen Zuverlässigkeitskriterien wie Spezifität, Richtigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit angewendet (32).

a) Spezifität

Die aus Urinproben durch Mehrfachmessungen erhaltenen Analysenwerte für Pregnandiol und Pregnantriol ließen sich mit Standardmengen authentischer Steroide direkt vergleichen (Abb. 5) und ergaben mit diesen identische Retentionszeiten, wie die Tabelle 1 zeigt. Störungen wurden bei der angegebenen Methode nur bei maximal 1 % der Urine beobachtet, wobei zum einen Isomere- wie das normalerweise nur in äußerst geringer Menge im Urin nachweisbare Allo-Pregnandiol (30), zum anderen extrem hohe 17-Ketosteroid-Gehalte verantwortlich sind. Das Ausweichen auf die QF 1 Säule mit ihrer veränderten Elutionsfolge schafft praktisch immer Abhilfe (siehe Abb. 7).

b) Richtigkeit

Die mittlere prozentuale Wiederfindung von je 10,22 µg PD und 13,77 µg PT nach Zusatz von enzymatisch hydrolysiertem Urin ergibt sich bei 16 Messungen als Maß für die Richtigkeit aus dem Verhältnis vom Ist- zum Sollwert.
Die Werte ergeben sich aus folgenden Gleichungen:

Der Mittelwert $\bar{x}$ aus den Meßwerten x_i erhält man durch Teilen der Gesamtsumme x_i durch die Anzahl der Messungen

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{\Sigma x_i}{n}$$

Die Näherungsstandardabweichung als Maß für die Güte eines Meßverfahrens (32) ergibt sich aus der Formel:

$$(2)\quad \sigma = \pm\sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Dies entspricht aber der vereinfachten Formel

$$(3)\quad \sigma = \pm\sqrt{\frac{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{n}}{n-1}}$$

Mit der Formel (3) erspart man sich den Rechenvorgang der Differenzbildung zwischen Meßwert und Mittelwert.

Der Variationskoeffizient, als Maß für den relativen Fehler, erhält man nach:

$$(4)\quad V = \frac{\sigma \cdot 100}{\bar{x}} \quad ; \quad V = [\%]$$

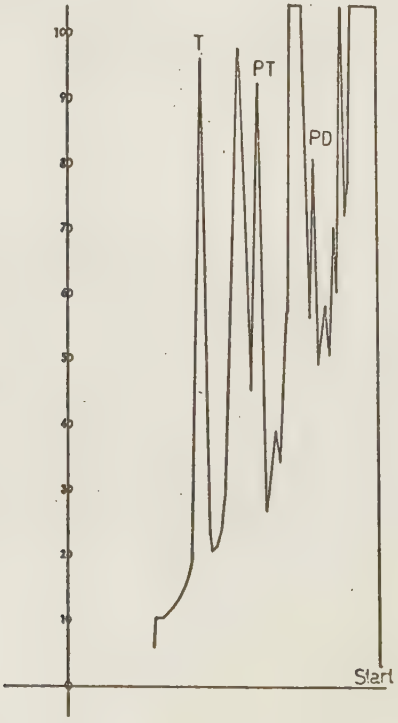


Abb. 7

Tabelle II

Einzelmessungen zur Ermittlung der Wiederfindung

Substanz	Höhe	Halbwertsbreite	Fläche	Gehalt /ug	Wiederfindung (%)
1) PD	154,3	2,50	364	10,72	104,8
PT	119,8	3,65	407	11,96	86,9
T			131		
2) PD	151,8	2,35	358	9,57	93,6
PT	121,8	3,35	414	11,07	80,4
T			144		
3) PD	178,0	2,05	365	9,02	88,3
PT	139,7	3,05	426	10,56	76,7
T			156		
4) PD	171,3	2,4	411	8,90	87,1
PT	150,6	3,25	490	10,60	77,0
T			178		
5) PD	149,6	2,3	353	9,84	96,3
PT	133,3	3,38	453	12,65	91,9
T			138		
6) PD	-	-	-	-	-
PT	171,2	3,1	582	12,19	88,5
T			184		
7) PD	222,0	2,35	524	11,03	107,9
PT	165,2	3,38	562	11,84	86,0
T			183		
8) PD	194,0	2,3	458	10,80	105,6
PT	144,2	3,3	490	11,57	84,0
T			163		

Fortsetzung Tabelle II

Substanz	Höhe	Halbwertsbreite	Fläche	Gehalt /ug	Wiederfindung (%)
9) PD	143,2	2,42	338	9,49	92,9
PT	116,4	3,55	396	11,15	81,0
T			137		
10) PD	-	-	-	-	-
PT	178,7	3,5	608	11,02	80,0
T			373		
11) PD	186,5	2,35	440	8,99	88,0
PT	151,6	3,45	515	10,55	76,6
T			330		
12) PD	130,3	2,35	308	9,19	89,9
PT	104,0	3,4	354	10,55	76,6
T			226		
13) PD	140,4	2,45	331	9,40	92,0
PT	113,0	3,65	384	10,95	79,5
T			237		
14) PD	160,0	2,38	378	9,13	89,3
PT	133,2	3,45	453	10,95	79,5
T			279		
15) PD	116,2	2,45	274	7,57	74,1
PT	112,0	3,45	380	10,55	76,6
T			243		
16) PD	162,0	2,45	382	10,21	99,9
PT	121,8	3,5	414	11,09	80,5
T			252		

Tabelle II stellt die Einzelmeßergebnisse zur PD-und PT-Wiederfindung zusammen. Als Bezug dient Testosteron (T). Zugegeben wurden 10,22 /ug PD und 13,77 /ug PT.

Für die einzelnen Peaks wurden die Halbwertsbreiten - siehe Tabelle II - gemittelt.
Es ergeben sich folgende Werte für

Testosteron : 1,90 mm bei n = 16
Pregnandiol : 2,36 mm
Pregnantriol : 3,40 mm

Die Flächenintegrale wurden mit den so erhaltenen gemittelten Halbwertsbreiten errechnet. Die mittlere prozentuale Wiederfindung ergab sich aus dem Verhältnis von Ist- zu Sollwert.
Sie betragen für

Pregnandiol : 93,6 $\pm$ 8,9 % [V = 9,5 %]
Pregnantriol : 81,4 $\pm$ 4,8 % [V = 5,9 %]

c) Genauigkeit

Die Bestimmung der Genauigkeit - von manchen Autoren in Anlehnung an den englischen Sprachgebrauch auch Präzision genannt - bezieht sich wiederum auf die Standardabweichung σ , ermittelt aus den Ergebnissen von Doppel- und Dreifach- (Mehrfach-) Bestimmungen.

In Tabelle III sind die Ergebnisse von 30-Mehrfach-Analysen zusammengestellt:

Tabelle III

Mehrfachmessungen zur Ermittlung der Genauigkeit

U 3	PD = 15,21	PT = ± 8,49
3-fach	S = ± 0,50	S = ± 1,03
	V = 3,28 %	V = 12,16 %
U 4	PD = 14,08	PT = 9,06
3-fach	S = ± 0,58	S = ± 1,15
	V = 4,10 %	V = 12,69 %
U 5	PD = 16,04	PT = ± 8,72
2-fach	S = ± 0,08	S = ± 1,19
	V = 0,48 %	V = 13,62 %
U 6	PD = 14,08	PT = ± 8,06
4-fach	S = ± 1,06	S = ± 1,68
	V = 7,50 %	V = 20,87 %
U 8	PD = 12,77	PT = (6,90)
3-fach	S = ± 0,36	S = ± 1,24
	V = 2,80 %	V = 17,99 %
U 10	PD = 17,72	PT = 11,58
4-fach	S = ± 0,76	S = ± 1,48
	V = 4,28 %	V = 12,80 %
U 11	PD = 15,51	PT = 10,82
2-fach	S = ± 0,37	S = ± 0,59
	V = 2,39 %	V = 5,45 %
U 12	PD = 15,38	PT = 10,21
3-fach	S = ± 0,39	S = ± 0,61
	V = 2,53 %	V = 5,97 %
U 14	PD = 12,39	PT = 7,82
3-fach	S = ± 0,42	S = ± 0,57
	V = 3,43 %	V = 7,28 %
U 17	PD = 13,96	PT = 9,53
3-fach	S = ± 0,17	S = ± 0,64
	V = 1,22 %	V = 6,75 %

U_3, U_4 etc. sind die Kodierungen der einzelnen Analysen. 2-fach, 3-fach bedeutet der Einzelmessungen, also n = 2, n = 3.

30 Bestimmungen als Wiederholungsmessungen in Serien zu Zwei-, Drei- und Vierfachbestimmungen ergaben als Mittelwert insgesamt für

Pregnandiol:

$$\overline{PD}_{30} = 14{,}71\,/\mu g/15\ ml$$

$$\sigma = \pm 1{,}57$$

und

Pregnantriol:

$$\overline{PT}_{30} = 9{,}12\,/\mu g/15\ ml$$

$$\sigma = \pm 1{,}44$$

Die Einzelwerte wurden nach ( ) auf Ausreißer durch folgende Gleichung statistisch geprüft:

$$(5) \quad A = \bar{x} \pm a\,(P;n) \cdot \sigma$$

Dabei bedeutet A die Ausreißerschranke (Maximalwerte), $\bar{x}$ den Mittelwert, P bedeutet die in der Gaschromatographie allgemein übliche statistische Sicherheit* von 95 %, n ist die Zahl der Meßwerte und σ ist die Standardabweichung. Den Wert a erhält man aus statistischen Tabellen; beträgt unter den gegebenen Bedingungen a = 3,80.

---

* Die Gesamtheit der Meßwerte als Funktion ihrer Größe ist im Idealfall eine Gaußkurve. Durch Flächenintegration zwischen Kurvenzug und Abszissenachse in den Grenzen $\bar{x} \pm a$ erhält man einen in Prozenten angebbaren Teil der Gesamtfläche. Dieser Bruchteil gibt die Wahrscheinlichkeit (= statistische Sicherheit P) dafür an, daß ein neuer Meßwert in das Intervall $\bar{x} \pm a$ fällt. Bei der in der Gaschromatographie üblichen statistischen Sicherheit von P = 95 % entspricht dies, bei Gleichsetzung von $a = \sigma$, einer Integrationsgrenze k (P) . σ von etwa 2σ.

Aus den Mehrfachbestimmungen (der Tabelle III) und den daraus zu bildenden Mittelwerten gelingt eine eindeutige Angabe der Meßwerte für PD und PT. Statistisch wird dieser Mittelwert durch Angabe des Vertrauensbereiches Q festgelegt.

(6) $Q = \bar{x} \pm \sigma \cdot t\,(P;n) / \sqrt{n}$

Dabei bedeuten wieder σ = Standardabweichung, P = statistische Sicherheit von 95 %, n = Anzahl der Meßwerte, t ist ein statistischer Faktor und entsprechenden Tabellen zu entnehmen; er beträgt für n = 30 und P = 95 % : t = 2,04:$\sqrt{30}$ = 0.372

Daraus ergibt sich der Vertrauensbereich für

PD von $\bar{x} \pm$ 0,59
PT von $\bar{x} \pm$ 0,54

Auf eine Tagesausscheidung von 1200 ml bezogen bedeutet das eine Abweichung vom Mittelwert für

PD von $\bar{x} \pm$ 0,047 mg/24^h und für
PT von $\bar{x} \pm$ 0,043 mg/24^h

Zur Bestimmung der Genauigkeit bei verschiedenen Steroid-Konzentrationen wurde zu demselben Urin (s. Tabelle III) nach der Hydrolyse in der Reihe PD-2 (n=21) zur Einzelprobe jeweils 20,44 /ug Pregnandiol und 13,77 /ug Pregnantriol und in der Reihe PT-2 (n=20) 10,22 /ug Pregnandiol und 27,54 /ug Pregnantriol zugegeben. Die Analysenergebnisse der Reihe PD-2 sind in der Tabelle IV zusammengefaßt. Die 21 Bestimmungen setzten sich aus Einzel-Serien von jeweils zwei bis vier Analysen zusammen. Es sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für Pregnandiol und -triol angegeben. Ausreißer traten nicht auf.

Aus 21 Bestimmungen ergaben sich als Mittelwert für

Pregnandiol: $\overline{PD}_{21}$: 34,24 ug/15 ml
σ : $\pm$ 1,87
V : 5,5 %

Pregnantriol: $\overline{PT}_{21}$: 20,57 ug/15 ml
σ : $\pm$ 1,59
V : 7,7 % .

Tabelle IV (Reihe PD-2)

Mehrfachmessungen zur Ermittlung der Genauigkeit und Richtigkeit

U 13	PD = ± 33,10	PT = ± 19,35
4-fach	S = ± 0,50	S = ± 0,41
	V = 1,50 %	V = 2,13 %
U 15	PD = ± 35,90	PT = ± 22,24
3-fach	S = ± 0,49	S = ± 1,95
	V = 1,35 %	V = 8,75 %
U 16	PD = ± 31,63	PT = ± 20,69
3-fach	S = ± 0,11	S = ± 0,68
	V = 0,35 %	V = 3,27 %
U 1	PD = ± 34,12	PT = ± 20,03
3-fach	S = ± 0,11	S = ± 0,98
	V = 0,32 %	V = 4,90 %
U 2	PD = ± 34,88	PT = ± 19,51
2-fach	S = ± 0,28	S = ± 0,30
	V = 0,79 %	V = 1,52 %
U 7	PD = ± 32,97	PT = ± 19,00
3-fach	S = ± 0,95	S = ± 0,26
	V = 2,89 %	V = 1,34 %
U 9	PD = ± 37,07	PT = ± 23,21
3-fach	S = ± 0,38	S = ± 3,03
	V = 1,03 %	V = 13,07 %

U_{13}, U_{14} sind die Kodierungen der einzelnen Analysen. 2-fach, 3-fach bedeutet Anzahl der Einzelmessungen, also n = 2, n = 3. Die Messwerte ergeben sich nach Zugabe von jeweils 20,44 γ/ug PD und 13,77 γ/ug PT. S bedeutet Standardabweichung, V bedeutet Variationskoeffizient.

Bezogen auf den 24-Stundenurin bedeutet das:

a) eine Wiederfindung als Maß für die Richtigkeit der Methode

Soll: PD:14,71 + 20,44
=35,15 µg/15 ml

PT: 9,12 + 13,77
=22,89 µg/15 ml

für Pregnandiol: 97,4 %

$= \pm 5{,}3$

V = 5,5 %

für Pregnantriol: 89,9 %

$= \pm 7{,}0$

V = 7,7 %

b) Aus den Mehrfachbestimmungen der Reihe PD - 2 (s. Tab. IV) ergibt sich darüber hinaus statistisch ein Vertrauensbereich als Maß für die Genauigkeit nach

(6) $Q = \bar{x} \pm \sigma \cdot t\,(P;n)\,\sqrt{n}$ für n = 21

und sich einen daraus ergebenden t-Wert =

$$\frac{2{,}09}{4{,}5826} = 0{,}456$$

als Vertrauensbereich für PD:

$Q = 1{,}87 \cdot 0{,}456 = \pm 0{,}85$ µg/15 ml

Bezogen auf eine Gesamturinmenge von 1200 ml entspricht das einer Varianz von $\pm$ 0,060 mg/24^{h}.

Für Pregnantriol errechnet sich ein Vertrauensbereich von:

$$Q = 1{,}59 \cdot 0{,}456$$
$$= \pm 0{,}73\,/\mu g/15\ ml$$
$$\triangleq 0{,}058\ mg/24^{h}$$

Die Versuchsreihe PT - 2 mit zugefügten Mengen von je 10,22/ug Prengandio und 27,54/ug Pregnantriol zum hydrolysierten Urin ergaben, bei (n = 20) in Serien von Doppel- und Dreifachbestimmungen, Werte die in Tabelle V zusammengefaßt sind. Von den Einzelserien sind jeweils die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten angegeben. Es traten keine Ausreißer auf. Aus den aus Tabelle III ersichtlichen Werten errechnen sich die Sollwerte für

Pregnandiol: 14,71 + 10,22 = 24,93/ug/15 ml
und
Pregnantriol: 9,12 + 27,54 = 36,66/ug/15 ml

Aus 20 Bestimmungen wurden als Mittelwerte gefunden für

Pregnandiol : $\overline{PD}_{20}$ = 25,43/ug/15 ml
σ = $\pm$ 0,80
V = 3,15 %

und für

Pregnantriol: PT_{20} = 35,81/ug/15 ml
σ = $\pm$ 0,96
V = 2,67 %

Bezogen auf den 24-Stundenurin bedeutet das:

a) eine Wiederfindung als Maß für die Richtigkeit für
Pregnandiol von: 102,0 %
σ : $\pm$ 3,2
V : 3,2 %

und für

Pregnantriol von : 97,7 %
σ : $\pm$ 2,6
V : 2,7 %

Tabelle V (Reihe PT-2)

Einzelwerte zur Ermittlung der Varianz, Genauigkeit und Richtigkeit

U 18	PD = ± 24,61	PT = ± 35,24
3-fach	S = ± 0,27	S = ± 0,90
	V = 1,11 %	V = 2,56 %
U 19	PD = ± 25,37	PT = ± 35,56
3-fach	S = ± 0,33	S = ± 0,23
	V = 1,29 %	V = 0,66 %
U 20	PD = ± 26,41	PT = ± 35,91
3-fach	S = ± 0,83	S = ± 0,67
	V = 3,15 %	V = 1,87 %
U 21	PD = ± 25,19	PT = ± 35,29
3-fach	S = ± 1,37	S = ± 3,25
	V = 5,44 %	V = 9,20 %
U 22	PD = ± 25,34	PT = ± 34,60
3-fach	S = ± 0,45	S = ± 0,80
	V = 1,77 %	V = 2,32 %
U 23	PD = ± 24,50	PT = ± 36,59
3-fach	S = ± 0,18	S = ± 1,88
	V = 0,73 %	V = 5,15 %
U 24	PD = ± 26,56	PT = ± 37,47
2-fach	S = ± 0,23	S = ± 0,46
	V = 0,88 %	V = 1,23 %

U 18, U 19 sind die Kodierungen der einzelnen Analysen. 2-fach, 3-fach bedeutet Anzahl der Messungen, also n = 2, n = 3. Die Meßwerte ergeben sich nach Zugabe von 10,22 µg PD und 27,54 µg PT. S und V sind stellvertretend für Standardabweichungen bzw. Variationskoeffizient.

Aus den Mehrfachbestimmungen der Serie PT-2 ergibt sich statistisch als Maß für die Genauigkeit der Methode nach

$Q = \bar{x} \pm \sigma \cdot t\,(P;n) / \sqrt{n}$ für n = 20 und sich einen daraus ergebenden t-Wert = $\frac{2.09}{4,4721} = \pm 0,467$

als Vertrauensbereich für

Pregnandiol: $Q = \bar{x} \pm 0,80 \cdot 0,467$

$= \bar{x} \pm 0,37\,\mu g/15\ ml$

Bezogen auf die Tagesurinausscheidung von 1200 ml entspräche das einer Varianz von

$\pm 0,03\ mg/24^h$

Für Pregnantriol ergibt sich ein Vertrauensbereich von $Q = \bar{x} \pm 0,96 \cdot 0,467$

$= \bar{x} \pm 0,45\,\mu g/15\ ml$

$= \bar{x} \pm 0,04\ mg/24^h$

d) Die Empfindlichkeit

Per definitionem versteht man unter der Empfindlichkeit E einer Nachweismethode die kleinste Substanzmenge, die sich von Null noch signifikant unterscheidet, d.h.

$$(7) \qquad E = \frac{t \cdot \sigma}{\sqrt{n}}$$

wird stellvertretend als geometrisches Mittel der Gesamtstandardabweichungen von n = 87 Messungen genommen. t ergibt sich bei einer statistischen Sicherheit von P = 95 % und n = 87 aus Tabellen (31,32) als

$$t = \frac{1,9877}{\sqrt{87}} = 0,2131$$

für Pregnandiol mit σ: 1,47

E = 0,31 µg/15 ml

≙ 0,025 mg/24^h

und für
Pregnantriol mit $\sigma = 1{,}43$
$E = 0{,}31\,\mu g/15\ ml$
$\hat{=}\ 0{,}025\ mg/24^h$
wobei ein mittleres Ausscheidungsvolumen von 1200 ml vorausgesetzt wird.
Es wurden die Mittelwerte der Wiederfindungen den Berechnungen zugrunde gelegt. Die einzelnen Meßreihen unterschieden sich durch die Zugabe von verschiedenen Mengen an authentischem Pregnandiol bzw. -triol.
Die Zufallsfehler innerhalb der beiden Meßreihen ergeben die Standardabweichung (32) nach der Gleichung

$$= \sqrt{\frac{\Sigma(x_1 1 - \bar{x}_1)^2 + \Sigma(x_i 2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

und daraus bei der vereinbarten statistischen Sicherheit P (von 95 %) mit $n = n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden den Vertrauensbereich

$$\Delta \bar{x} = t\,(P;n) \cdot \sigma_M = \frac{t\,(P;n) \cdot \sigma}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 / (n_1 + n_2)}}$$

Ein Unterschied ($\bar{x}_1 - \bar{x}$) zwischen den Meßreihen gilt als statistisch gesichert, wenn $t > t\,(P;n)$ ist.
Signifikante Unterschiede treten nur zwischen den Pregnantriol - nicht bei den PD-Werten - der einzelnen Reihen auf.
Das deutet auf einen systematischen Fehler hin, der vermutlich auf die Nichtverwendung eines geeigneten Temperaturprogramms bei der Gaschromatographie liegt. Dies erkennt man aus der Form des Gaschromatogramms (Peakverbreiterung) und an den unterschiedlichen Halbwertsbreiten, wobei Pregnantriol die ungünstigsten Werte aufweist: (s. Seite 37).

Testosteron : 1,90 mm ;
Pregnandiol : 2,36 mm ; } bei n = 16
Pregnantriol ; 3,40 mm ;

7. Normalwerte

Bei gesunden Probandinnen werden Pregnandiolwerte zwischen 0,20 und 4,60 mg/24 h gefunden, wobei ohne ein funktionierendes Corpus luteum bis zu 1,2 mg/24 h beobachtet werden.
Pregnantriolwerte werden im Bereich zwischen 0,20 und 2,24 mg/24 h gemessen.
Diese Werte entsprechen in engen Grenzen den neueren Literaturangaben, z.B. von WOTIZ (10), der für Pregnandiol in der Proliferationsphase 0,48 $\pm$ 0,31 mg/24 h und für die Lutealphase 2,68 $\pm$ 1,68 mg/24 h angibt. Die Pregnantriolwerte lagen bei FOTHERBY (10) im Bereich von 0,1 - 3,0 mg/24 h.

D Diskussion der Ergebnisse

Die modernen Methoden der Pregnandiol- und -triolbestimmung zeichnen sich gegenüber den ersten gravimetrischen Analysen von VENNING (106) vor etwa 40 Jahren durch verfeinerte Technik bei hoher Präzision und Empfindlichkeit aus. Lag noch die Nachweisgrenze bei der gravimetrischen Methode bei etwa 5 mg, so führte die Gaschromatographie in den letzten zehn Jahren in einen zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Bereich, was besonders den Bestimmungen mit niedrigem Steroidtiter zugute kommt und den Werten eine stärkere Aussagekraft verleiht.
Während BARRY und Mitarbeiter (4) selbst den frühen gaschromatographischen Arbeiten noch unterstellen, sie würden aufgrund zu geringer Spezifität neben allen möglichen Pregnandiolisomeren auch Pregnanolon erfassen bzw. nicht gut genug trennen, so gilt dies in noch stärkerem Maße für die älteren photometrischen Methoden und ihren Varianten (41, 48, 66, 99).
So betonen HAMMERSTEIN und ZIELSKE in einer jüngeren Arbeit (49), daß das für mehrere Jahre als Standardmethode benutzte Verfahren von KLOPPER (66) in seinem ursprünglichen Arbeitsgang trotz einer ALLEN-Korrektur (2) nicht in der Lage ist, die bei der Schwefelsäurereaktion störenden Chromogene auszuschalten.
Dies trifft in verstärktem Maße auf Pregnandiolwerte der Follikelphase und bei der Bestimmung der Pregnanderivate bei Kindern zu.
Erst bei der Kombination der Klopperschen-Methode in Verbindung mit der Gaschromatographie als quantitative Endbestimmung läßt sich eine zuverlässige Aussage machen.

Die gaschromatographischen Verfahren lassen sich hauptsächlich anhand ihrer Hydrolysen- und Derivatisierungsbedingungen unterscheiden. Zu den älteren bekannten Methoden mit Bestimmung des freien Pregnandiol zählen die Arbeiten von

JONES und Mitarbeiter (61), TURNER und Mitarbeiter (100), PATTI und Mitarbeiter (81), JANSEN (59), BARRY und Mitarbeiter (4) und COX (26), während WOTIZ (110) und KIRSCHNER und LIPSETT (65) die entsprechenden Pregnandiolacetate auswerteten.
Erst die Untersuchungen von VANDEN HEUVEL (103) und LUUKKAINEN (72) führte zu der zur Zeit wohl gängigsten Methode der TMSI-Ätherbildung. Diese Derivate bieten den Vorteil der verlängerten Retentionszeit, besserer Flüchtigkeit, Hitzestabilität, geringerer Säulenabsorption, gutem Response und ausbleibendem Tailing (64,86,103).

Während des Aufarbeitungsverfahrens zur Pregnandiol- und -triolbestimmung ist der Hydrolyseschritt sehr problematisch. Wenn für die Pregnandiolkonjugate sowohl Säure- als auch Enzymhydrolysen gebräuchlich sind, so muß bei Pregnantriol und ähnlichen Steroiden bei der heißen Säurehydrolyse mit Umlagerungen (20,21) und Abbaureaktionen (11,25, 29, 59,100) gerechnet werden;
daher ist auch für das Pregnandiol die enzymatische Spaltung mit ß-Glucuronidase und Sulfatase (Glusulase, Helicase) eindeutig vorzuziehen. Gleichzeitig werden störende Artefakte vermieden.
Als weiterer Vorteil der Enzymspezifität erweist sich bei dieser Methode, daß die Sulfatase nur 5ß-Konjugate hydrolysiert. Dadurch halten sich z.B. im Gaschromatogramm sonst störende Mengen von Androsteron, 11-Ketoandrosteron und 11-Hydroxyandrosteron von vornherein in Grenzen.
Darüberhinaus fanden WAKABAYASHI und FISHMANN (107), daß während der enzymatischen Hydrolyse die Pregnankonjugate gegenüber den entsprechenden Östrogen- und Androgenmetaboliten schneller gespalten werden, was den selektiven Charakter der Methode unterstreicht. So werden z.B. die Glucuronide bei dem von uns benutzten pH-Wert von 4,5 bei gleicher Temperatur und Hydrolysenzeit von Pregnandiol zu 90 %
Testosteron zu 50 %
epi-Androsteron zu 30 % und
Dehydroepiandrosteron zu 60 %
gespalten.

In der Literatur werden viele Methoden der Enzymhydrolyse beschrieben, die sich durch Variation der Parameter Enzymkonzentration, Temperatur und Hydrolysedauer unterscheiden (29). So benutzten z.B. SCHOLLER und Mitarbeiter (91) hohe Enzymkonzentration, hohe Inkubationstemperatur und kurze Hydrolysezeit.
Längere Hydrolysezeiten von 12 h (68,110), 24 h (100), 48 h (51) bis zu 72 h (65, 88) werden u.a. deswegen bevorzugt, um neben Pregnandiol und -triol Ketosteroide und andere Metabolite (11) bzw. Steroide mit höherem Titer aus Schwangerenurin zu bestimmen.
Bei Arbeiten mit erhöhten Temperaturen muß nach WAKABAYASHI und FISHMAN (107) beachtet werden, daß die Enzymaktivität der Sulfatase zwischen 65 $^{\circ}$ und 75° C erlischt, während die Glucuronidase noch intakt bleibt, was zu einem verfälschten Analysenergebnis führen würde.
Die von uns benutzten Hydrolysenbedingungen mit einem Enzymextrakt aus Helix Pomatia (107) nutzten die beschriebenen Vorteile der enzymatischen Spaltung besonders gut aus. Sie basieren auf Versuchsreihen, durch die optimale Hydrolysezeiten und -temperaturen und die geeignetsten Enzymkonzentration pro ml Urin gefunden wurden, um eine Inhibitorwirkung (50) mit ungenügender Aufspaltung der Pregnandiol- und -triolkonjugate auszuschalten und gleichzeitig eine Begrenzung unerwünschter Begleitsteroide nach Zahl und Menge zu erreichen; das "biologische Rauschen" im späteren Gaschromatogramm wird so weitgehend unterdrückt, was besonders wichtig ist, wenn überwiegend Urine mit niedrigem Pregnandiol- und Pregnantriol-Titer zur Untersuchung gelangen.
Darüberhinaus verläuft die von uns durchgeführte enzymatische Bestimmung dermaßen störungsfrei, daß auf eine weitere allgemein übliche Vorreinigung des Hydrolysats durch Dünnschicht- oder Säulenchromatographie verzichtet werden kann. Dazu kann auch eine inzwischen verbesserte und standardisierte Enzympräparation beigetragen haben. Auch traten Schwierigkeiten bei der Hydrolyse durch Emulsionsbildung, wie es von CURTIUS und MÜLLER (29) beschrieben wird, nicht auf.

Den Steroid-Trimethylsilyäthern haftet der Nachteil der hohen Zersetzlichkeit durch Luftfeuchtigkeit an. Dies läßt sich jedoch durch vorsichtiges Arbeiten mit Schliffkölbchen und sofortigem Weiterarbeiten vermeiden. Das von uns verwendete MSTFA zeichnet sich gegenüber älteren Silylierungsagentien durch mehrere Vorteile aus.
Seit über zehn Jahren zählt der Einsatz von Hexamethyldisilazan (HMDS) in Verbindung mit TMCS nach HORNING und Mitarbeiter (55) zu den Standardmethoden.
Aus der Reihe der silylierten Amide stammen die Verbindungen wie N,O-Bis -trimethylsilylacetamid (BSA), N-Methyl-N-trifluoracetamid (MSA), Bis-trimethyl-trifluoracetamid (BSTFA) und das von uns benutzte N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA), das sich von allen durch größte Flüchtigkeit und höchstes Silylierungsvermögen auszeichnet. So genügt bei MSTFA zur Derivatbildung schon kurzzeitiges Erwärmen unter Zusatz von katalytischen Mengen von TMCS. Ein Lösungsmittel braucht, im Gegensatz zur Methode von HORNING, nicht benutzt zu werden. Ebenso kann auf ein Eindampfen der Lösungs- und Silylierungsmittel verzichtet werden, so daß durch die sofortige Injizierbarkeit des Steroid-Derivats eine Zeitersparnis resultiert.

Silylierungen bei höheren Temperaturen und über längere Zeiten sind zu vermeiden, da beim Testosteron Enolsilylätherbildung erfolgt, was auch von GLEISPACH (42) beobachtet wurde.

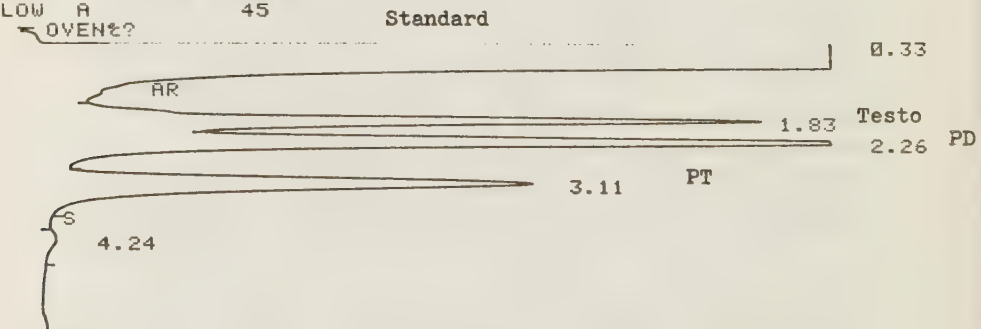
Bei der vorliegenden Methode, in der Testosteron als innerer Standard benutzt wird - nach HAMMERSTEIN und ZIELSKE (49) eine unbedingt notwendige Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der Methode- ist dies besonders wichtig, da durch unkontrollierbare Veränderungen der Bezugssubstanz eine quantitative Auswertung hinfällig wird.
Auf der anderen Seite liegt bei der Verwendung von Testosteron-TMSi als internem Standard die Retentionszeit der-

maßen günstig, wie in der Tabelle I gezeigt wird, daß normalerweise keine Interferenz mit Androgenen, bzw. Ketosteroiden vorkommt. Aus dem gleichen Grund kann auch auf einen Alternativstandard, so wie ihn HAMMOND und LEACH (50) beschreiben, verzichtet werden. In den seltenen Fällen (< 1 %), in denen das GC einen Hinweis auf mangelnde Trennung gibt, könnte auf 17α-Methyltestosteron als innerem Standard bzw. auf eine Alternativsäule mit 5 % QF 1 übergewechselt werden. Bei dieser Säulenphase findet man bei 240° C Säulentemperatur, 30 ml N_2/min flow, gleicher Säulenlänge und I.D. eine veränderte Elutionsreihenfolge der Steroide mit den Retentionszeiten für PD, PT und Testosteron von 1,0; 2,0 bzw. 2,9 min. (s. Abb. 6, Seite 31). Dabei muß erwähnt werden, daß im Urin auch endogen auftretendes Testosteron bei der Standardisierung nicht stört; denn bei einer angenommenen Ausscheidung von 10/ug/24 h (1200 ml) entspräche dies bei dem von uns verwendeten Aliquot von 15 ml einer maximal antreffbaren Menge von 0,13/ug. Bezogen auf zugesetztes Standard-Testosteron in Höhe von 30/ug, läge der Gehalt unter 0,5 %. Dazu kommt, daß - wie schon vorher erwähnt - Testosteronglucuronid nicht vollständig extrahiert bzw. nur zu 50 % hydrolysiert wird, wodurch eine solche Störung vernachlässigbar ist.
Ebenso vorteilhaft hat sich auf OV 1 die Reihenfolge der Substanzen (T,PD,PT) mit den Retentionszeiten 1,8; 2,3 bzw. 3,1 min. (s. Abb. 8) gegenüber anderen Methoden erwiesen, auch im Vergleich zu den ebenfalls benutzten Säulenphasen XE 60 und QF 1. Entsprechend den Arbeiten von GUPTA und Mitarbeiter (46) fanden wir, verglichen mit anderen Derivatisierungsmitteln und Säulenphasen wie QF1, SE30,XE60 und OV17, einen optimalen Response bei TMSi-Derivaten und einer 2 %igen OV1 Säule.

Bezüglich der Zuverlässigkeitskriterien ist zu sagen, daß sie in allen Punkten den Werten der modernen gaschromatographischen Verfahren, wie sie von BREUER (10) zusammengefaßt wurden entsprechen. Dabei muß hervorgehoben werden,

daß die Empfindlichkeit der vorgestellten Methode schon bei einem Aliquot von 1/80 des 24-Stunden-Urins bei 0,033 mg/24 h liegt. Eine Steigerung der Empfindlichkeit kann bei Vergrößerung des Aliquots noch erreicht werden.
Abschließend sei erwähnt, daß die vorliegende Methode eine Abänderung des Verfahrens von NOCKE (75) ist, das im selben Hause entwickelt worden ist.
Bei sichtlicher Zeitersparnis und besserer Spezifität wurden in Hinsicht auf Zuverlässigkeit und Wertebereich keine Einbußen beobachtet.

```
 AREA REJ -
   1.2   AREA REJ      2
   1.8   AREA REJ      2
DELETE TIME TBL
AREA REJ - @
AREA REJ 2 MIN? 1 . 2 @
TEMP1 2 3 0 @
   1.2   AREA REJ      2
 TEMP1      230   230
FLOW  A              45
   OVEN?
```




```
hp 5830A
AREA %
```

RT	AREA	AREA %
1.83	91200	30.507
2.26	120900	40.442
3.11	85220	28.506
4.24	1630	0.545

XF: 1.0000 E+ 0

Abbildung 8

E Zusammenfassung

Beschrieben wird eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von PD und PT im Urin, deren Einsatz klinische Bedeutung hat für die Zyklusdiagnostik und für die Aufdeckung von Steroidbiosynthesestörungen in der Nebennierenrinde.
Gegenüber üblichen Bestimmungsverfahren zeichnet sich diese Methode - eine Kombination bereits prinzipiell bekannter Arbeitstechniken - durch einfache, sehr schnelle und besonders zuverlässige Durchführung aus, womit dieses Verfahren auch für klinische Laboratorien mittlerer Größe interessant ist.

Im Rahmen gynäkologischer Fragestellungen hat sich diese Methode besonders bei Urin mit niedrigem Metabolit-Titer bewährt.
Die im Urin überwiegend als Glucuronide vorliegenden Progesteron- bzw. 17α-Hydroxyprogesteron-Metabolite Pregnandiol und Pregnantriol werden zunächst durch enzymatische Hydrolyse mit Helix pomatia-Extrakt freigesetzt.
Der Hydrolyseschritt wurde hier dahingehend optimiert, daß mit den angeführten Enzymkonzentrationen, Zeitdauer und Temperatur eine sichere und praktisch vollständige Spaltung der Pregnan-Konjugate erzielt wird bei gleichzeitig unvollständiger Hydrolyse der Androsteron-, Etiocholanolon- und Dehydroepiandrosteron-Konjugate.
Dies erleichtert und vereinfacht die GLC-Auftrennung. Eine Hemmung des Enzymaktivitäten durch urinäre Inhibitoren wird bei der vorgeschriebenen Verdünnung nicht beobachtet.
Die freigesetzten Steroide werden mit Toluol extrahiert und anschließend silyliert, wofür sich die Verwendung von MSTFA/TMCS (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid/ Trimethylchlorsilan) unter den gewählten Bedingungen als besonders vorteilhaft erweist.

Die Trennung erfolgt auf GLC-Säulen mit 2 % OV 1 oder alternativ im Falle ungenügender Trennung auf 5 % QF 1 mit dem Vorteil der veränderten Elutionsfolge.
Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines inneren Standards (Testosteron oder 17α-Methyltestosteron) entweder manuell über die Dreiecksmethode durch Flächenvergleich der Pregnandiol-, -triol und Testosteron-Peaks oder durch elektronische Integration.
Die Vollwertigkeit dieser Analysenmethode liegt in seiner großen Spezifität, Richtigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit, die an Hand dieser Zuverlässigkeitskriterien statistisch überprüft und den bislang gebräuchlichen Methoden gegenübergestellt wurde. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur gut überein.

F Literaturverzeichnis

1. ALLEN, W.M. und WINTERSTEINER, O.:
Crystalline Progestin.
Science (New York) 80, 190 (1934)

2. ALLEN, W.M.:
A simple method for analysing complicated absorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids.
J. clin. Endocr. 10, 71 (1950)

3. ASTWOOD, E.B. und JONES, G.E.S.:
A simple method for the quantitative determination of pregnanediol in human urine.
J. biol. Chem. 137, 397 (1941)

4. BARRY, R.D., GUARNERI, M., BESCH, P.K., RING, W. und BESCH, N.F.:
Comparison of four methods of derermining urinary pregnanediol.
Anal. Chem. 38, 983 (1966)

5. BEALL, D.:
A method for the isolation of pregnandiol from human pregnancy urine.
Biochem. J. 31, 35 (1937)

6. BEERTHUIS, R.K. und RECOURT, J.H.:
Sterol analysis by gas chromatography.
Nature 186, 372 (1960)

7. BLOCH, K.:
On the utilization of acetic acid for cholesterol formation.
J. biol. Chem. 145, 625 (1942)

8. BLOCH, K.:
The biological conversion of cholesterol to pregnanediol.
J. biol. Chem. 157, 661 (1945)

9. BONGIOVANNI, A.M. und CLAYTON, G.W.:
Simplified method for routine determination of pregnanediol and pregnanetriol in urine.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 94, 180 (1954)

10. zitiert nach: BREUER, H.:
Methoden der Hormonbestimmungen.
Thieme, Stuttgart (1975)

11. BROOKS, C.J.W., CHAMBAZ, E. und E.C. HORNING:
Thin layer and column chromatographic group separations of steroids as trimethylsilyl ethers. Isolation for GLC analysis of pregnanediol and estriol in pregnancy urine.
Anal. Biochem. 19, 234 (1967)

12. BUCHHOLZ, R., DIPPELT, L. und SCHILD, W.:
Über die Bildung des Progesterons im mensuellen Zyklus.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 14, 620 (1954)

13. BURSTEIN, S. und LIEBERMANN, S.:
Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures.
J. biol. Chem. 233, 331 (1958)

14. BUSH, I.E., SWYER, G.I.M., STERN, M.I. und WILLOUGHBY, M.L.N.:
Adrenocortical hyperplasia: report of a case with studies of the excretion of steroid metabolites.
J. Endocr. 15, 430 (1957)

15. BUTENNANDT, A.:
Über das Pregnandiol,einen neuen Sterinabkömmling aus Schwangerenharn.
Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 659 (1930)

16. BUTENANDT, A. und SCHMIDT, J.:
Überführung des Pregnandiols in Corpus-luteum-Hormon.
Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1901 (1934)

17. BUTENANDT, A., WESTPHAL, W. und HOHLWEG, W.:
Über das Hormon des Corpus luteum.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 227, 84 (1934)

18. BUTLER, G.C. und MARRIAN, G.F.:
The isolation of gregnane 3-, 17-, 2o-triol from the urine of women showing the adrenogenital syndrome.
J. biol. Chem. 119, 565 (1937)

19. CAWLEY, L.P., MUSSER, B.O. und TRETBAR, H.A.:
Gas liquid chromatography of urinary 17-ketosteroids, pregnanediol and pregnanetriol in normal individuals.
Amer. J. of clin. pathol. 48, 216 (1967)

20. CHAMBERLAIN, J., KNIGHTS, B.A. und THOMAS, G.H.:
A system of analysis by gaschromatography of 17α-pregnane-3,20-diols and their identification as metabolites of progesterone in man, the monkey,rabbit and guinea-pig.
J. Endocr. 28, 235 (1964)

21. CHAMBERLAIN, J., KNIGHTS, B.A., THOMAS, G.H.:
Analysis of steroid metabolites by gas chromatography.
J. Endocr. 26, 367 (1963)

22. CHANEY, A.L., MCKEE, W.E., FISCHER, R.H. und MCCOLGAN, S.P.:
A new and simplified procedure for the determination of free pregnanediol in urine, and its evaluation.
J. clin. Endocr. 12, 735 (1952)

23. COHEN, S.L.:
The hydrolysis of steroid glucuronides with calf spleen glucuronidase.
J. biol. Chem. 192, 147 (1951)

24. COURCY, E. de:
A trichloracetic acid reagent for the detection of pregnane - 3α, 17α, 20α-triols on paper chromatograms.
J. Endocr. 14, 164 (1956)

25. COX, R.I.:
Gas chromatography in the analysis of urinary pregnanediol.
J. Chromatogr. 12, 242 (1963)

26. COX, R.I.:
The separation and quantitative estimation of pregnane - 3α, 17α, 20α-triol, pregnane 3α, 17α, 20α-triol - one and other urinary acetaldehydrogenic steroids.
J. biol. Chem. 234, 1693 (1959)

27. CREECH, B.G.:
Separation and determination of ketosteroids, pregnandiol and pregnantriol on one column.
J. of Gaschromatogr. 2, 194 (1964)

28. CURTIUS, H.Ch.:
Gaschromatographische Bestimmung von Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon im Urin.
Z. Klin. Chem. 4, 114 (1966)

29. CURTIUS, H.C. und MÜLLER, M.:
Gas-Liquid chromatography of 17-ketosteroids and progesterone metabolites of urine: comparison of different methods of hydrolysis.
J. Chromatogr. 30, 410 (1967)

30. DETTER, F. und KLINGMÜLLER, V.:
Untersuchung über die Pregnandiol- und Allopregnandiolausscheidung im Cyclus der Frau mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.
Clin. Chim. Acta 15, 481 (1967)

31. DIEM, K. und LEUTNER, C.:
Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen.
Wehr, Basel, S. 28 (1973)

32. DOERFEL, K.:
Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen.
Z. anal. Chem. 185, 1 (1962)

33. DONICKE, M.:
N-Methyl-N-trimethyl-silyl-trifluoracetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide.
J. Chromatogr. 42, 103 (1969)

34. DROSDOWSKY, M.A., DESSYPRIS, A., MCNIVEN, N.L., DORFMANN, R.I. und GUAL, C.:
A search for progesteron in human urine.
Acta endocr. (Kbh.) 49, 553 (1965)

35. EHRHARD, G. und RUSCHIG, H.:
Arzneimittel III (Therapeutica mit Wirkung auf den Respirations- und Verdauungstrakt; Hormone)
S. 305, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1972)

36. EIK-NES, K.B.:
Effects of gonadotrophins on secretion of steroids by the testis and ovary.
Physiol. Rev. 44, 609 (1964)

37. ENGEL, L.L., THORN, G.W. und LENIS, R.A.:
The urinary excretion of steroid compounds.
J. biol. Chem. 137, 205 (1941)

38. FOTHERBY, K. und LOVE, D.N.:
A modified method for the estimation of pregnanetriol in urine.
J. Endocr. 20, 157 (1960)

39. FOTHERBY, K.:
The ovarian production of a pregnantriol precursor.
J. Endocr. 25, 19 (1962)

40. FRAENKEL, S.:
Zur Funktion des Corpus luteum.
Arch. Gynäk. 68, 438 (1902)

41. FURUHJELM, M.:
Pregnandiol excretion in women.
Acta endocr. (Kbh.) 14, 353 (1953)

42. GLEISPACH, H.:
The use of different silylating agents for structure analyses of steroids.
J. Chromatogr. 91, 407 (1974)

43. GOLDZIEHER, J.W. und NACAMURA, Y.:
A clinical method for the determination of urinary pregnanetriol und pregnanediol.
Acta endocr. (Kbh) 41, 371 (1962)

44. GRAEF, V. und FUCHS, M.:
Untersuchungen zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten im Harn.
Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 163 (1975)

45. GRAY , C.H.:
Klinische Biochemie.
Seite 145, Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)

46. GUPTA, D., BREITMAIER, E., JUNG, G., v.LUCADOU, G., PAUSCHMANN, H. und VOELTER, W.:
Gaschromatographischer Vergleich von Trimethylsilyl-, Trifluoracetyl - und Heptafluorbutyrat - Derivaten von Steroiden.
Chromatographia 4, 572 (1971)

47. HAAHTI, E.O.A., van den HEUVEL, W.J.A. und HORNING, E.C.:
Separation of urinary 17-ketosteroids by gas chromatography.
Anal. Biochem. 2, 182 (1961)

48. HAMMERSTEIN, J.:
Hormonanalytische Untersuchungen zur Frage der endokrinen Korrelationen im biphasischen Menstruationszyklus der Frau.
Arch. Gynäk. 196, 504 - 540 (1962)

49. HAMMERSTEIN, J. und ZIELSKE, F.:
Zur Methodologie der Pregnandiolbestimmung im Harn.
Z. Anal. Chem. 243, 272 (1968)

50. HAMMOND, K.B. und H. LEACH:
A routine method for the determination of urine pregnanediol and pregnanolone by gas chromatography.
Clin. Chim. Acta 15, 145 (1967)

51. HAMMOND, K.B. und LEACH, H.:
The gas chromatography of pregnane series steroids.
Clin. chim. Acta 11, 584 (1965)

52. HARTMANN, M. und WETTSTEIN, A.:
Ein kristallisiertes Hormon aus Corpus luteum.
Helv. Chim. Acta 17, 878 (1934)

53. HERMANN, W. und SILVERMANN, L.:
Excretion of pregnane - 3α, 17α, 20α-triol in pregnancy.
J. Endocr. 20, 236 (1960)

54. HOOKER, C.W. und FORBES, F.K.:
A bioassay for minute amounts of progesterone.
Endocr. 41, 158 (1947)

55. HORNING, E.C., van den HEUVEL, W.J.A. und CREECH,B.G.:
Separation and determination of Steroids by gas chromatography.
Methods Biochem. Anal. 11, 69 (1963)

56. HUBER, D.:
Determinations of pregnanediol in urine for diagnostic purposes.
Biochem. J. 41, 609 (1947)

57. HUNTER, W.M. und GREENWOOD, F.C.:
Preparation of iodine-131 labelled growth hormone of high specific activity.
Nature (London) 194, 495 (1962)

58. ISMAIL, A.A.A. und HARKNESS, R.A.:
The isolation of progesterone from human pregnancy urine.
Biochem. J. 98, 15 (1966)

59. JANSEN, A.P.:
Determination of pregnanediol in urinary extracts by gas-liquid chromatography.
Clin. chim. Acta 8, 785 (1963)

60. JONES, H.W. und P.G. WEIL:
The corpus luteum hormone in early pregnancy.
J. Amer. med. Ass. 111, 519 (1938)

61. JONES, G.E.S., TURNER, D., SARLOS, I.J., BARNES, A.C. und COHEN, R.:
The determination of urinary pregnanediol by gas liquid chromatography.
Fertil. Steril. 13, 544 (1962)

62. KAISER, R.:
Chromatographie in der Gasphase. Band I - IV;
B.I. Mannheim, 1960 - 1973

63. KAUFMANN, C.:
Progesteron, sein Schicksal im Organismus und seine Anwendung in der Therapie.
Klin. Wschr. 33, 345 (1955)

64. KINOSHITA, K., ISURUGI, K., KUMAMATO, Y. und TAKAYASU, H.:
Gaschromatographic estimation of urinary pregnanetriol, pregnanetriolon and pregnanetetrol in congenital adrenal hyperplasia.
J. Clin. Endocr. 26, 1219 (1966)

65. KIRSCHNER, M.A. und LIPSETT, M.B.:
The analysis of urinary steroids using gas liquid chromatography.
Steroids 3, 277 (1964)

66. KLOPPER, A., MICHIE, E.A., BROWN, J.B.:
A method for the determination of urinary pregnandiol.
J. Endocrin. 12, 209 (1955)

67. KLOPPER, A.I., STRONG, J.A. und COOK, L.H.:
The excretion of pregnanediol and adrenocortical activity.
J. Endocr. 15, 180 (1957)

68. LARSEN, A.L. und ENGSTROM, A.W.:
The determination of estrogen and progesterone metabolites in urine in pregnancy by gas chromatography.
Amer. J. Clin. Pathol. 46, 352 (1966)

69. LAURITZEN, C.:
Östrogene und Gestagene beim Menschen.
Naturwiss. Rundschau 18, 7 (1965)

70. LEON, Y.A. und BULBROOK, R.D.:
A modification of a method for the determination of urinary pregnanetriol.
J. Endocr. 20, 236 (1960)

71. LISBOA, B.P.:
Application of saturated 21-deoxy-pregnane steroids.
Steroids 6, 605 (1965)

72. LUUKKAINEN, T., van den HEUVEL, W.J.A., HAAHTI, E.O.A. und HORNING, E.C.:
Gas chromatographic behaviour of trimethylsilyl ethers of steroids.
Biochim. biophys. Acta 52, 599 (1961)

73. MARRIAN, G.F.:
The chemistry of oestrin. Preparation from urine and separation from an unidentified solid alcohol.
Biochem. J. 23, 1090 (1929)

74. MAUGHAN, G.B., EVELYN, K.A. und BROWNE, S.L.:
A method for the quantitative estimation of glucuronic acid and conjugatet glucuronides.
J. biol. Chem. 126, 567 (1938)

75. NOCKE, L.:
Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Pregnantriol aus einer Urinprobe.
Z. Anal. Chem. 252, 322 (1970)

76. NOCKE, W.:
Influence of gonadotrophin administration of urinary steroids secretion in cases of ovarian failure.
Acta Endocr. Suppl. 119, 74 (1967)

77. NOIRET, R. und DEVIS, R.:
Fractionnement sur colonne de florisil des phenol-steroides, du "pregnandiol", du "pregnantriol", des 17-cetosteroides et des steroides alpha-cetols.
Ann. Biol. clin. 24, 1179 (1966)

78. OAKS, D.M., BONELLI, E.J. und DIMICK, K.P.:
Quantitative gaschromatography of urinary steroids using a new liquid phase.
J. Gaschromatogr. 3, 353 (1965)

79. OERTEL, G.W. und GROOT, K.:
Estimation of pregnanediol and pregnanetriol in urine.
Clin. chim. Acta 11, 512 (1965)

80. PANICUCCI, F. und TAPONECO, G.:
La gas-cromatografia nel dossagio simultaneo degli 11-deossi-17-chetosteroidi, degli 11-ossi-17-chetosteroidi, del pregnandiolo e del pregnantriolo urinari.
Folia Endocrinol. 18, 188 (1965)

81. PATTI, A.A., BONANNO, P., FAWLEY, T.F. und STEIN, A.A.:
Gasphase chromatography in separation and identification of pregnanediol in urine and blood of pregnant women.
Obstet. and Gynec. 21, 302 (1963)

82. PEARLMAN, W.H.:
Circulating steroid hormone levels in relation to steroid hormone production.
Ciba Foundn. Coll. Endocr. 11, 233 (1957)

83. PEARLMAN, W.H. und THOMAS, M.:
The conversion of Δ^5-pregnen-3ß-ol-20 one to progesterone by homogenates of human placental tissue.
J. biol. Chem. 208, 231 (1954)

84. PETERSON, R.A. und EILERS, E.A.:
The use of labeled acetic anhydride in steroid assays.
Intern. Congr. Ser. 83, Proceedings of the second Intern. Congr. of Endocr., Part. I, p. 267, London. Excerpta med. Foundn. (1964)

85. PLOTZ, E.J.:
Die Anwendung radioaktiver Isotope in der Erforschung des Gestagenstoffwechsels in der Schwangerschaft.
in H. Nowakowsky, 6. Symp. Dtsch. Ges. Endokr., S. 21, Kiel (1959)

86. RAMAN, P.B., AVRAMOV, R., McNIVEN, M.L. und DORFMAN, R.I.:
A method for the determination of pregnanediol, pregnanetriol and pregnanetriolone by gas chromatography.
Steroids 6, 177 (1965)

87. REIN, H. und SCHNEIDER, M.:
Physiologie des Menschen.
S. 311, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1973)

88. RIVERA, R., DORFMAN, R.I. und FORCHIELLI, E.:
A modified method for the analysis of urinary 17-ketosteroid , pregnanediol and pregnanetriol by gas liquid chromatography in normal subjects and subjects with various endocrine disorders.
Acta Endocr. 54, 37 (1967)

89. ROY, A.B.:
The steroid sulfatase of Patella vulgata.
Biochim. J. 62, 41 (1956)

90. SAVARD, K. und RICE, B.F.:
Gonadotrophins and ovarian steroidogenesis.
Rec. Progr. Hormone Res. 21, 285 (1965)

91. SCHOLLER et. al. Europ. J. Steroids 1, 373 (1966)
zitiert nach: von de Calseyde, J.F., Scholtis, R.J.H., Schmidt, N.A.,und Kuypers, A.M.J.: Assay of pregnanediol and pregnanetriol in low-titre urines by gas chromatography.
Clin. Chim. Acta 27, 139 (1970)

92. SEEGAR, G.E. und DELFS, E.:
Pregnandiol excretion following bilateral oophorectomy in early pregnancy.
J. Amer.med.Ass. 115, 1267 (1940)

93. SHEN, N.H.C., KATZMAN, M.B., FRANCIS, F.E. und KINSELLA, R.A.:
Determination of pregnanolone, pregnanediol and pregnanetriol in urine.
J. Lab. clin. Med. 61, 174 (1963)

94. SLOTTA, K.H., RUSCHIG, H. und FELS, E.:
Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum.
Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1270 (1934)

95. SOMMERVILLE, I.F., MARRIAN, G.F. und KELLAR, R.J.:
Rapid determination of urinary pregnanediol.
Lancet 1948 II, 89

96. STARKA, L. und MALIKOVA, J.:
A simple method for the separation of pregnanetriols by spread-layer chromatography.
J. Endocr. 22, 215 (1960)

97. SWEAT, M.L., BERLINER, D.L., BRYSON, M.J., NABROS, Ch., HASKELL, J. und HOLMSTROM, E.G.:
The synthesis and metabolism of progesterone in the human and bovine ovary.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 40, 289 (1960)

98. SWEELEY, C.C. und HORNING, E.C.:
Microanalytical separation of steroids by gas chromatography.
Nature 187, 144 (1960)

99. TALBOT, N.B., BERMAN, R.A., MAC LACHLAN, E.A. und WOLFE, J.K.:
Colorimetric determination of neutral steroids (hormones) in a 24-hour sample of human urine (pregnanediol, total α-and ß-alcoholic, and nonalcoholic 17- ketosteroids).
J. clin. Endocr. 1, 68 (1941)

100. TURNER, D.A., JONES, G.E.S., SARLOS, I.J., BARNES, A.C. und COHEN, R.:
Determination of urinary pregnanediol by gas chromatography.
Anal. Biochem. 5, 99 (1963)

101. UFER, J.:
Hormontherapie in der Frauenheilkunde.
S. 14, De Gruyter-Verlag, Berlin-New York (1972)

102. VAN DER MOLEN, H.J. in: Eik-Nes, K.B. und Horning, E.C.:
"Gas Phase Chromatography of Steroids",
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, S. 218 (1968)

103. VAN DEN HEUVEL, W.J.A., CREECH, B.G. und HORNING, E.C.:
Separation and estimation of the principal human 17-ketosteroids as trimethylsilyl ethers.
Anal. Biochem. 4, 191 (1962)

104. VENNING, E.H. und BROWNE, J.S.L.:
Isolation of a water-soluble pregnandiol complex from human pregnancy urine.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 34, 792 (1936)

105. VENNING, E.H. und BROWNE, J.S.L.:
Urinary excretion of sodium pregnandiol glucuronidate in the menstrual cycle.
(An excretion product of progesterone).
Amer. J. Physiol. 119, 417 (1937)

106. VENNING, E.H.:
Gravimetric method for the determination of sodium pregnandiol glucuronidate (an excretion product of progesterone).
J. biol. Chem. 119, 473 (1937)

107. WAKABAYASHI, M. und FISHMAN, W.H.:
The comparative ability of ß-glucuronidase preparations (liver, E.coli, Helixpomatia and patella vulgata) to hydrolyze certain steroid glucosiduronic acids.
J. Biol. Chem. 236, 996 (1961)

108. WESTPHAL, U.:
Über den Nachweis von Pregnandiol Glucuronid im Harn normaler Frauen und Männer.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 281, 14 (1944)

109. WOTIZ, H.H.:
Studies in steroid metabolism. XV. The rapid determination of urinary pregnanediol by gas chromatography.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 69, 415 (1963)

110. YALOW, R.S. und BERSON, S.A.:
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature 184, 1648 (1959)

111. ZAMORA, E., PLATTNER, D. und CURTIUS, H.Ch.:
Determination of urinary pregnanediol, pregnanetriol and pregnanetriolon in normal children and adults by gas chromatography.
Acta endocr. (Kbh.) 62, 315 (1969)

112. ZANDER, J.:
Progesterone. In R.I. Dorfman: Methods in hormone research, vol. 1, p. 91 ;
New York und London, Academic Press (1962)

Herrn Professor Dr.G.Sturm, Laborleiter an der Universitäts-Frauenklinik Marburg (Direktor: Professor Dr. R. Buchholz) danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats. Darüber hinaus danke ich ihm für die mir erwiesene wissenschaftliche Unterstützung, die wertvollen Ratschläge und Anregungen bei der Abfassung des Manuskripts.

Ebenfalls danke ich Herrn Doz. Dr. R. BRAUN für die freundliche Übernahme des Correferats.

Frau S. Götze und Frl. U. Schäfer danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Steroidbestimmungen.

LEBENSLAUF

Am 24.11.44 wurde ich als Sohn der Eheleute Friedrich und Erika Kuschak, geb. Schütte, in Berlin-Altlandsberg geboren. Von 1951 - 1955 besuchte ich die Volksschule und von 1955 - 1964 das Gymnasium in Wuppertal, wo ich am 20.2.1964 die Reifeprüfung bestand.
Mit dem Studium der Chemie begann ich im Wintersemester 1964/65 an der Philipps-Universität in Marburg. Dort legte ich am 22.2.1967 die Diplomchemiker-Vorprüfung und am 23.10.1972 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ab. Anschließend fertigte ich am Institut für Polymere die Diplomarbeit mit dem Thema "Über die Bildung von Lysinoalanin und Lanthionin mit Dehydroalaninderivaten in Keratinfasern" bei Professor Dr. G. Ebert an. Das Diplom erhielt ich am 7.1.1974. Zum Sommersemester 1974 begann ich mit dem Studium der Humanbiologie in Marburg. In der Universitäts-Frauenklinik fertigte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Sturm die vorliegende Arbeit an.
Seit dem 1.3.1976 bin ich als Assistent am Diabetes - Forschungsinstitut der Universität Düsseldorf beschäftigt.